

ANTHOCYANBILDUNG IN GEWEBEKULTUREN UND KEIMLINGEN
VON HAPLOPAPPUS GRACILIS UND IHRE ABHÄNGIGKEIT
VOM LICHT

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Irene Lackmann
aus Berlin

1969
—

ANTHOCYANBILDUNG IN GEWEBEKULTUREN UND KEIMLINGEN
VON HAPLOPAPPUS GRACILIS UND IHRE ABHÄNGIGKEIT
VOM LICHT

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Irene Lackmann

aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert
2. Referent: Prof. Dr. Th. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.1968

Tag der Promotion: 12. FEB. 1969

INHALT

	Seite
A. <u>EINLEITUNG</u>	5
B. <u>MATERIAL UND METHODE</u>	9
I. Versuchsobjekte	
II. Bestimmung des Anthocyangehaltes	
III. Lichtquellen	
C. <u>ERGEBNISSE</u>	
a. <u>Gewebekulturen von Hapopappus</u>	22
I. Variabilität der Gewebe	
II. Einfluß von Temperatur und Dauer der Bestrahlung auf die Anthocyan- synthese der Gewebekulturen	
III. Temperaturempfindlichkeit und Licht- bedürftigkeit der Anthocyansynthese in ihren einzelnen Phasen	
IV. Abhängigkeit der Anthocyansynthese vom Medium	
b. <u>Keimlinge von Haplopappus</u>	66
I. Außenfaktoren	
II. Anthocyanbildung in den einzelnen Organen	
III. Verwundungseffekt	
c. <u>Spektrale Abhängigkeit der lichtinduzier- ten Anthocyansynthese in Keimlingen und Gewebekulturen</u>	75
I. Wirkungsspektren der Anthocyan- synthese	
II. Rotlichtbestrahlungen	
D. <u>DISKUSSION</u>	95
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	116
F. <u>LITERATUR</u>	119

Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

In allen Fällen, in denen bisher eine Wirkung von natürlicher Sonnenstrahlung oder von ungefiltertem Kunstlicht auf die Anthocyansynthese gefunden wurde, handelte es sich um eine Förderung der Pigmentbildung.

Wenn bei einer Reihe von Pflanzen für den gleichen physiologischen Prozeß eine Lichtabhängigkeit besteht, so ist damit noch nicht sicher, daß das Licht in allen Fällen seine Wirkung auch über die gleichen Reaktionen entfaltet. Bei einer so vielgliedrigen und verzweigten Reaktionskette wie der Anthocyansynthese muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß verschiedene Pigmentsysteme an der Absorption des Lichtes beteiligt sind. Darüber hinaus können auch in ein und derselben Pflanze mehrere lichtabhängige Umsetzungen am Zustandekommen der Gesamtwirkung beteiligt sein.

Erst in neuerer Zeit wurde es durch die Entwicklung moderner Spektralanlagen möglich die Wirkungsbereiche der Photorezeptoren genau zu bestimmen. Durch monochromatische Bestrahlung der Objekte im sichtbaren und ultravioletten Bereich des Spektrums konnten in den letzten zwei Jahrzehnten detaillierte Aussagen über Natur und Wirkungsweise der Photorezeptoren, die bei der Anthocyansynthese eine Rolle spielen, gemacht werden.

Die Frage nach dem wirksamen Wellenlängenbereich ist bisher für Rotkohl- und Rübenkeimlinge (SIEGELMAN und HENDRICKS 1957), Sinapis (MOHR 1957), Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN 1963), Buchweizen (MOHR und VAN NES 1963), Spirodela (THIMANN und Mitarbeiter 1964) und für Äpfel (DOWNS und Mitarbeiter 1965) ausführlich beantwortet worden.

Danach liegen Wirkungsbereiche des Spektrums für die Anthocyansynthese bei hohem Energiebedarf im Ultraviolett um 300 nm, im Blau gegen 450 nm sowie im Rot zwischen 600 und 740 nm. Fast immer wird eine Aktivität im Rotlicht von einer Blaulichtwirkung begleitet (Rotkohl, Rüben, Sinapis, Spirodela, Buchweizen und Äpfel). Jedoch kann bei einer Reihe von Pflanzen wie Sorghum, Impatiens (ARNOLD 1962) und Amaranthus (HEATH und VINCE 1962) nur Blaulicht die Pigmentsynthese induzieren.

Neben dem genannten Einfluß von Strahlung hoher Intensität auf die Anthocyansynthese, wird für eine Reihe von Objekten eine Wirkung von Hell- und Dunkelrotlicht bei geringem Energiebedarf beschrieben (Niederenergiereaktion). Die Pigmentbildung kann durch kurze Bestrahlung mit Hell und Trüdbrot gefördert, beziehungsweise gehemmt werden. Hier greift das Pigmentsystem Phytochrom in die Reaktion der Farbstoffbildung ein. Ein Einfluß des Phytochromsystems ist bisher für Sinapis, Rotkohl, Rüben, Sorghum und Äpfel nachgewiesen worden.

Die Ansichten über die Identität der Photorezeptoren für die Hochenergiereaktionen weichen stark voneinander ab. M o h r (1957) nahm an, daß ein einziges, allgemein verbreitetes Pigmentsystem, das im Blau und im langwelligen sichtbaren Bereich des Spektrums Gipfel der Absorption besitzt und nicht durch Phytochrom gesteuert wird, allen beobachteten Hochenergiereaktionen zukommt. H e n d r i c k s (1960a) stellte eine Hypothese auf, nach der Phytochrom in jedem Falle der Photorezeptor ist. Danach führt langandauernde Bestrahlung und Anregung von Phytochrom P_{660} und P_{735} zu einer Energieübertragung auf andere Komponenten und damit zu einer irreversiblen Förderung über unbekannte Faktoren.

In früheren Arbeiten führten H e n d r i c k s und B o r t h w i c k (1959) auch die Aktivität im blauen Bereich des Spektrums auf Phytochrom zurück. Diese Annahme begründeten sie mit Versuchsergebnissen, in denen die Förderung durch Rotlicht immer erheblich stärker war, als die im kurzwelligen Teil des Spektrums. Das Verhältnis der unter Blau- und Rot- einfluß gebildeten Anthocyanmengen entsprach dem der Absorption von Phytochrom in Blau und Rotlicht.

Den ersten Hinweis darauf, daß über zwei verschiedene Reaktionen photochemische Reaktionen ausgelöst werden können, die in die Anthocyansynthese eingreifen, brachte das Wirkungsspektrum von Sorghum (HENDRICKS 1960 b). Nur Blaulicht hoher Energie induzierte die Pigmentbildung (DOWNS und SIEGELMAN 1963). Unter Rotlichtbestrahlungen zeigte sich auch bei hoher Intensität kein Effekt. Phytochrom konnte zwar den Prozeß beeinflussen, wirkte aber erst nach vorhergehender Induktion durch Blaulicht fördernd oder hemmend auf die Synthese ein.

D o w n s und Mitarbeiter (1965) zeigten, daß für die energiebedürftige Reaktion der Anthocyansynthese in Apfelschalen das photosynthetische System verantwortlich ist. Sie konnten die Anthocyanbildung durch den Photosynthesehemmstoff DCMU im Blau- wie im Rotbereich vollständig hemmen. In früheren Arbeiten hatten S i e g e l m a n und H e n d r i c k s (1958 a,b) als Photorezeptor für die durch Licht hoher Energie induzierte Anthocyansynthese ein Flavoprotein angenommen.

Genausowenig wie sich die bisher gefundenen Wirkungsspektren der Anthocyansynthese der einzelnen Objekte zur Deckung bringen lassen, ähneln sich die Bedingungen, die die Pflanzen an Umwelt und Ernährung stellen. Es scheint, als ob jedes Objekt eine

verschiedene physiologische Grundkonstellation braucht, um überhaupt Anthocyan bilden zu können.

Die folgende Arbeit befaßt sich mit der Anthocyan-synthese der Gewebekulturen (REINERT, CLAUSS und ARDENNE 1964) und Keimlinge von *Haplopappus gracilis*, die nur durch Blaulicht hoher Intensität induziert werden kann.

Zwei Objekte, die zwar die gleiche genetische Grundstruktur haben, sonst aber rein äußerlich nicht die geringste Ähnlichkeit miteinander aufweisen, werden auf ihre Reaktionsfähigkeit hin untersucht. Im ersten Teil wird der Ablauf der Pigmentbildung verfolgt. Die äußeren und inneren Faktoren, die zur Biosynthese des Anthocyans in beiden Objekten notwendig sind, werden festgestellt. Der Hauptteil der Arbeit ist die Untersuchung der wirksamen Spektralbereiche und die Aufstellung der Wirkungsspektren der Anthocyan-synthese für Gewebekulturen und Keimlinge von *Haplopappus gracilis*.

MATERIAL UND METHODE

I. Versuchsobjekte

Objekte der vorliegenden Untersuchungen waren Keimlinge und Gewebekulturen aus dem Sproß von *Haplopappus gracilis*.

1. Keimlinge

Zur Anzucht der Pflänzchen wurden Samen verwendet, die in den Jahren 1966 und 1967 im eigenen Institutsgarten geerntet worden waren. Sie wurden eine Stunde lang in Natriumhypochloridlösung (1% freies Chlor) sterilisiert, unter sterilen Bedingungen auf Agarmedium ausgelegt und anschließend bei 25°C im Dunkeln gehalten. Der Nährboden enthielt neben White'schen Salzen und organischen Zusätzen (Tabellen I und II) 2% Saccharose und 0,6% Agar. Er wurde 20 Minuten bei 1 atü in fließendem Dampf autoklaviert.

Nach 10 Tagen waren die Keimlinge 3 cm hoch und konnten entweder für Lichtversuche verwendet werden oder, in Gewebestückchen zerteilt, der Anzucht von Gewebekulturen dienen. Die Proben für die Lichtversuche bestanden aus jeweils 10 Pflänzchen, die in einer Petrischale auf White'schem Medium ausgelegt und bestrahlt wurden.

2. Gewebekulturen

Das Material für alle Versuche zur Ermittlung der Lichtabhängigkeit der Anthocyansynthese im Gewebe waren Kulturen eines Stammes, die seit Oktober 1962 auf White'schem Medium (Tabelle III) wuchsen und im Dunkeln bei 20°C völlig pigmentfrei waren.

Für die Untersuchung der stofflichen Einflüsse auf die Anthocyanbildung wurden zum Teil neue Gewebe aus den Keimlingen herangezogen.

Der Nährboden für die Kultur der Gewebe in Röhrchen und für die Bestrahlung in Petrischalen war White'sches Medium (WHITE 1954) mit einem Zusatz von 2% Saccharose, 0,6% Agar und 5×10^{-9} g/ml 2,4 - D (siehe Tabellen I bis III).

Tabelle I: Salze nach White (REINERT und WHITE 1956)
für Nährlösungen von *Haplopappus gracilis* (mg/l Nährlös.)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	• 4 H_2O	289,0	mg/l Nährlösung
KCl		65	" "
KNO_3		80	" "
Na_2SO_4		200	" "
NaH_2PO_4	• 2 H_2O	19	" "
MnSO_4	• 4 H_2O	6,6	" "
ZnSO_4	• 7 H_2O	2,7	" "
H_3BO_3		1,5	" "
KJ		0,75	" "
MgSO	• 7 H_2O	738	" "
KH_2PO_4		12,5	" "
$(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,26 mg/100 ml Nährlösung)		

Tabelle II: Organische Zusätze zum White'schen Medium
für *Haplopappus gracilis* (mg/l Nährlösung)

Glycin	3,0	mg/l Nährlösung
Nikotinsäure	3,0	" "
Pyridoxin x HCl	0,1	" "
Thiamin	0,1	" "

Tabelle III: Zugaben zu 100 ml Nähragar für <i>Haplopappus gracilis</i>		
White'sche Salzlösung		10,0 ml
$\text{Fe}_1(\text{SO}_4)_3$	13 mg/50 ml	1,0 ml
organische Zusätze		0,1 ml
2,4-D (10^{-7} g/ml)		5,0 ml
Saccharose		2,0 g
Agar		0,6 g

Sollte die Wirkung von Phytohormonen (2,4-D, IES, Kinetin* und Gibberellinsäure) oder stickstoffhaltiger Substanzen (Nitrate, Glutaminsäure) oder auch verschiedener Zucker (Glucose, Fruktose) auf die Anthocyanbildung während längerer Zeit beobachtet werden, so befanden sich diese Substanzen von Anfang an, also während der gesamten Kulturperiode im Nährmedium.

Galt es dagegen den Einfluß einer intensiven und kurzen Behandlung mit einer der oben angeführten Substanzen festzustellen, so wurde das Gewebe vom festen Nähragar in flüssiges Whitemedium gebracht, dem der Wirkstoff zugesetzt war, darin einige Stunden auf einer Schüttelmaschine geschüttelt, abfiltriert und für die Bestrahlung auf Agarboden in Petrischalen verstrichen.

Die stickstoffhaltigen Substanzen, 2,4-D, IES und Kinetin konnten mit dem Medium zusammen autoklaviert werden, während Gibberellin kalt mit Äthyläther p.a. desinfiziert und steril dem Medium zupipetiert wurde. Ebenso wie mit Gibberellin, wurde auch mit dem Photosynthesehemmer DCMU (1,1-Dimethyl-3-(3,4-Dichlorphenyl)-Urean) verfahren.

* 2,4 D (Dichlorphenoxyessigsäure)
 IES (Indolyl-3-essigsäure)
 Kinetin (6-Furfuryl-aminopurin)

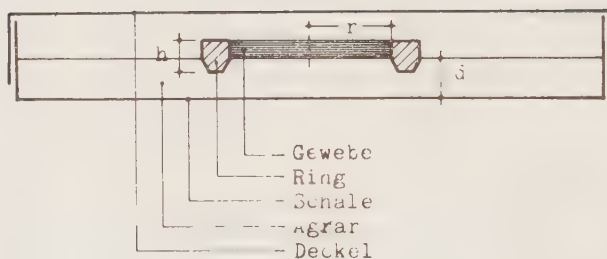


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Methode des Verstreichens.

Querschnitt durch eine Petrischale mit Agarschicht (Schichtdicke $d = 4 \text{ mm}$), Ring (Radius $r = 1 \text{ cm}$), Höhe ($h = 3 \text{ mm}$) und Gewebe

Zum Vergleich sind einige Versuche mit Gewebekulturen vorgenommen worden, die auf Skoog'schem Medium angezogen worden waren (modifiziertes Medium nach MURASHIGE und SKOOG 1962).

3. Methode des Verstreichens

Da nur die obersten Schichten des Gewebes bei Bestrahlung Pigment bildeten, wurde die dem Licht ausgesetzte Oberfläche als Bezugsgröße für die Menge des gebildeten Farbstoffs gewählt (siehe Seite 27). Die Größe dieser Fläche war in allen Versuchen konstant und betrug $3,14 \text{ cm}^2$.

Auf die 4 mm dicke Agarschicht in einer Petrischale wurde ein Glasring (3 mm Höhe, 2 cm lichte Weite) aufgesetzt. Das Versuchsmaterial, vier Wochen altes, weiches, weißes Gewebe füllte diesen Ring gleichmäßig aus, nachdem es mit einem Spatel vorsichtig verstrichen worden war. Auf diese Weise blieb nicht nur die Oberfläche, sondern auch die Schichtdicke der Proben konstant (siehe Abbildung 1).

Die Vorbereitung des Gewebes für den Versuch ging unter sterilen Bedingungen in der Impfkabine vor sich.

II. Bestimmung des Anthocyangehaltes

Zur Bestimmung des Anthocyangehaltes wurde das Gewebe mit der darunterliegenden Agarschicht aus der Schale genommen, im Glashomogenisator homogenisiert und mit einem HCl-Propanolgemisch (1% HCl, 25% Propanol) extrahiert (MOHR 1957). Nach dem Zentrifugieren der Homogenisate konnte die Extinktion des klaren Extraktes im Photometer "Eppendorf" bei 546 nm bestimmt werden. Die Extinktion der Lösungen

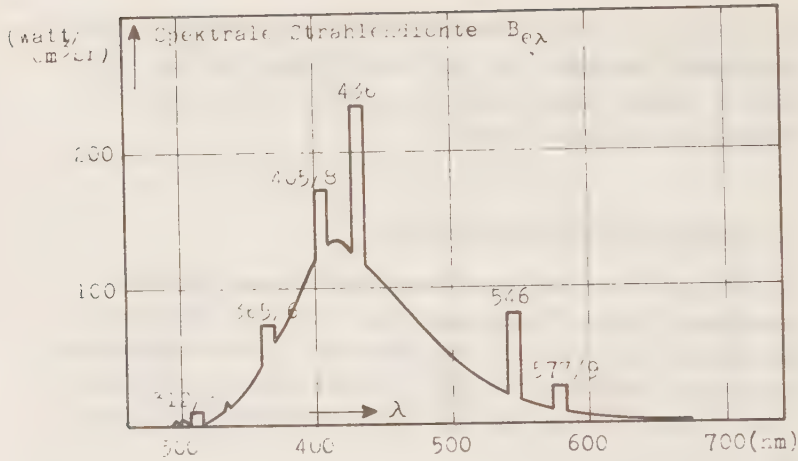


Abbildung 2: Spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhren Osram HNP.

Die Ordinate gibt die spektrale Strahlendichte B_e an ($\text{Watt} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$) die Abszisse die Wellenlänge λ in nm.

wurde auf die Oberfläche bezogen und für $3,14 \text{ cm}^2$ (Glasring $\varnothing = 2 \text{ cm}$) angegeben.

Die Keimlinge blieben so lange im Extraktionsmittel, bis sie völlig entfärbt waren. Sie wurden nicht homogenisiert. Nach der Extraktion des Farbstoffs konnten sie leicht aus dem HCl-Propanolgemisch entfernt werden. Die Bestimmung des Anthocyangehaltes erfolgte dann auf oben angeführte Weise.

In den Tabellen ist die Extinktion der Proben mit "E", die der Dunkelkontrollen mit "K" bezeichnet. Der Mittelwert aus diesen Daten ist als " E_m " angegeben.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde der Variationskoeffizient mit "V.K." und der Pearson'sche Korrelationskoeffizient mit "r" (GELLERT 1965) angeführt. Der mittlere Fehler ist in einigen Tabellen angegeben. Ein Vergleich von Meßreihen erfolgte nach dem t-Test (PÄTAU 1943).

III. Lichtquellen

Im Laufe der Untersuchungen mußten verschiedene Lichtquellen verwendet werden. Sie sind im Folgenden mit technischen Daten und Angaben über die Versuche, in denen sie Anwendung fanden, aufgeführt.

1. Blaulichtfelder

Für alle Vorversuche wurden Blaulichtröhren verwendet, die in einem Rahmen über einer Truhe mit Kühlaggregaten angebracht waren. Auch die Präinduktionen (vergleiche Seite 34) für die Versuche zur Ermittlung des Wirkungsspektrums der Gewebekulturen erfolgte in allen Fällen durch Bestrahlung der Gewebe in diesem Blaulichtfeld.

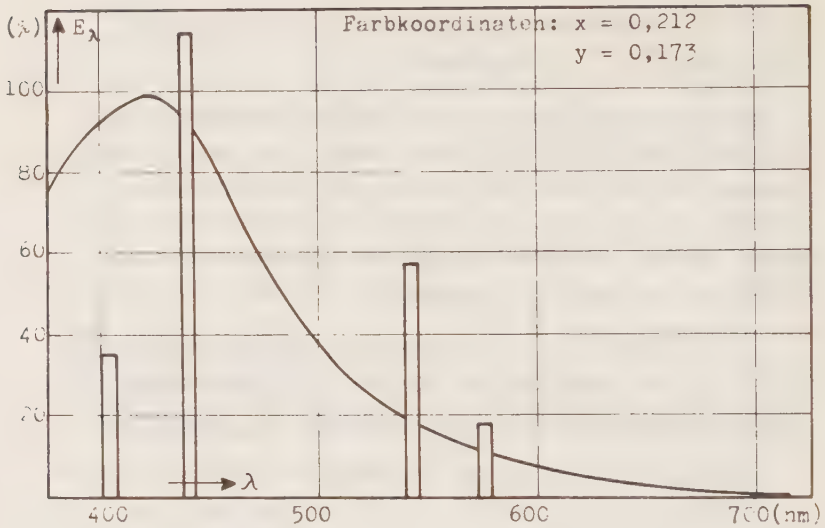


Abbildung 3: Spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhren Phillips TL, 40 W (Blau)

Die Ordinate gibt die prozentuale Emission (E_λ %) und die Abszisse die Wellenlänge λ in nm an.

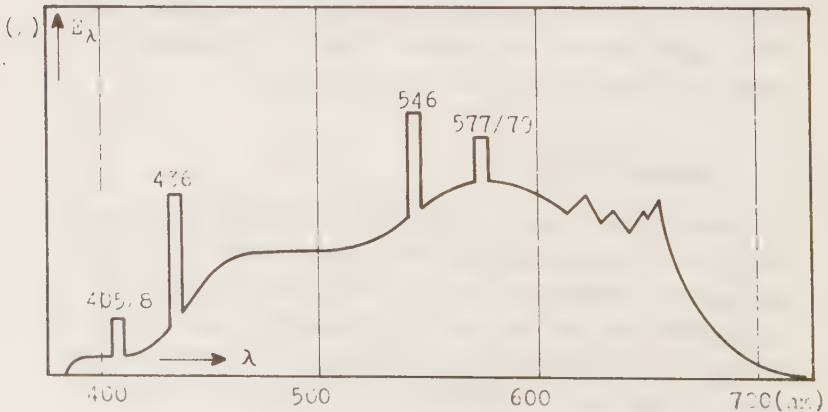


Abbildung 4: Spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhren Osram HNW de Luxe (Weiß). Die Ordinate zeigt die prozentuale Emission (E_λ %) und die Abszisse die Wellenlänge λ in nm.

Einstellen einer gewünschten Temperatur war möglich, jedoch betrafen die Schwankungen $\pm 3^{\circ}\text{C}$. Die Temperatur wurde in allen Versuchen auf 28°C festgelegt (siehe Seite 32).

Das Emissionsmaximum dieser Leuchtstoffröhren war 436 nm (Osram HNP 40 W, siehe Abbildung 2). Bei konstanter Entfernung von der Lichtquelle wurde das Gewebe mit einer Intensität von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bestrahlt. Diese Energiezufuhr blieb in allen Versuchen gleich. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Synthese von der Intensität wurden die Petrischalen mit den entsprechenden Neutralgläsern (Schott und Genossen) abgedeckt.

Das Temperaturoptimum der Anthocyansynthese wurde in einer Truhe ermittelt, die ein Kühl- und Heizaggregat besaß und in der sich die Temperatur genauer einstellen ließ. Die Schwankungen betrugen hier nur $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Das zu dieser Truhe gehörende Blaulichtfeld bestand aus Leuchtstoffröhren Phillips TL, 40 W. Das Emissionsmaximum lag bei 440 nm , und die Intensität während der Versuche betrug $11\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ (siehe Abbildung 3).

2. Weißlichtfelder

Ein Teil der Untersuchungen an Haplopappusgewebe ist bei Bestrahlung mit Weißlicht vorgenommen worden. Die beiden Weißlichtfelder, die zur Vorbestrahlung bei Rotlichtversuchen und bei der Selektion der Gewebe dienten, befanden sich jeweils in einem temperaturkonstanten Raum und strahlten mit einer Intensität von $20\,000$ bzw. $6\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ (Leuchtstoffröhren Osram HNW de Luxe, 40 W (Weiß)).

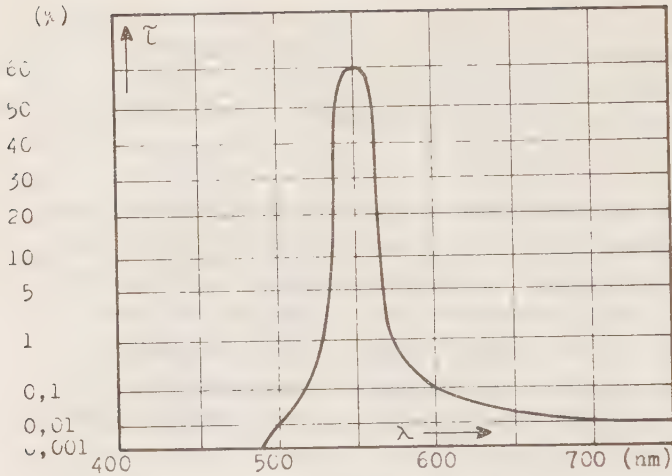
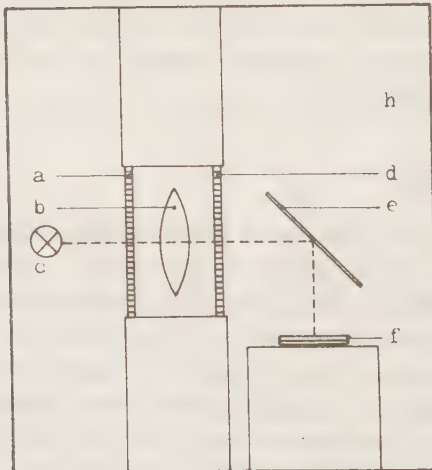


Abbildung 5: Typische Filterkurve für Bandfilter vom Typ AL (Schott und Genossen), Ordinate: Durchlässigkeit τ %, Abszisse: Wellenlänge λ (nm)



- a Wärmefilter
- b Sammellinse
- c Lampe
- d Interferenzfilter
- e Umkehrspiegel
- f Objekt
- h Bestrahlungsraum

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Anlage eines Spektralapparates

3. Spektralanlage

Das Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese der Keimlinge und Gewebekulturen für den sichtbaren Bereich des Lichtes wurde in einer Spektralanlage gewonnen (SCHOSER 1966). Diese Anlage bestand aus 10 Kammern in einem temperaturkonstanten Raum (Schwankungen $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Jede dieser Kammern konnte von außen her beleuchtet werden. Lichtquelle war eine Projektionslampe mit Glühfaden (Osram 58 82, 12V, 150W), die durch einen Ventilator gekühlt wurde. Zwischen Lampe und bestrahltes Objekt war ein ebenfalls durch Ventilation gekühltes Wärmefilter, eine Sammellinse, ein Interferenzfilter und ein Umkehrspiegel geschaltet. Die schematische Darstellung eines solchen Spektralapparates zeigt die Abbildung 6.

Zur Ermittlung des Wirkungsspektrums wurden Bandfilter (Typ AL, Schott, siehe Abbildung 5) mit einer Halbwertsbreite von 20 nm verwendet. Die Bestrahlung mit monochromatischem Licht erfolgte bei den Wellenlängen 406 nm, 438 nm, 450 nm, 474 nm, 493 nm, 498 nm, 520 nm, 551 nm, 611 nm, 666 nm und 713 nm.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Rotlicht hoher Intensität auf Keimlinge von Haplopappus mußte ein Breitbandfilter (660 nm) mit Vorsatz eingesetzt werden, damit $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ im Bestrahlungsfeld erreicht werden konnten.

Das Maximum der Emission der Projektionslampe lag im langwelligen Teil des Spektrums. Die Energieausbeute im Blaubereich blieb daher sehr gering. Bei 406 nm betrug die Intensität maximal $1\,134 \times 10^{12}$ bei 450 nm $1\,362 \times 10^{12}$ Quanten/ $\text{cm}^2\text{ sec}$. Das entspricht einer Energie von 5 000 und 6 000 $\text{erg/cm}^2\text{ sec}$ bezogen auf 450 nm. Da Gewebekulturen und Keimlinge in der Spektralanlage bei den verschiedenen

Wellenlängen mit gleicher Quantenstromdichte bestrahlt werden sollten (WITHROW und WITHROW 1956), waren $1\,134 \times 10^{12}$ Quanten/cm² sec die oberste Grenze der Intensität, die über den gesamten sichtbaren Bereich des Spektrums gegeben werden konnte.

Keimlinge von Haplopappus benötigten zur Induktion der Anthocyansynthese Blaulicht der Intensität von mindestens 10 000 erg/cm² sec. Diese Intensität konnte auch bei maximaler Beanspruchung der Lampen nicht erreicht werden. Daher wurden die Planspiegel in der Anlage durch Hohlspiegel ersetzt. Mit der Bündelung des Lichtes konnte so eine Intensitätssteigerung um das 2 bis 3-fache erreicht werden. Eine Begleiterscheinung war die Verzerrung und Inhomogenisierung des Lichtfeldes. Entstehende Unregelmäßigkeiten konnten jedoch zum Teil durch lange Bestrahlungsdauer wieder aufgehoben werden.

Zur Bestimmung der Lichtintensität im Bestrahlungsfeld diente eine geeichte Thermosäule, die an ein Voltmeter angeschlossen war ($1\,\mu\text{V} = 25,5 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$). Die gewünschte Intensität konnte mit Hilfe eines Regeltransformators eingestellt werden.

Die Versuche liefen bei konstanter Raumtemperatur von 28°C ab. Die Temperaturmessung erfolgte mit Hilfe eines sehr empfindlichen Sekundenthermometers unmittelbar im Nähragar einer bestrahlten Petrischale.

4. UV-Bestrahlungen

Zur Identifizierung des Photorezeptors mußte auch der langwellige Bereich des ultravioletten Lichtes (350 nm bis 400 nm) auf seine Wirksamkeit hin untersucht werden. Als Lichtquelle sollte in diesem Falle

eine Xenon-Hochdrucklampe (Osram XBO, 450 W) mit Strahlungskontinuum zwischen 300 und 1300 nm dienen. Die Leistung der Lampe, die in der Bestrahlungsanlage eingebaut war, war sehr gering. So betrug die Intensität bei 360 nm (UV-IL Linienfilter, Schott) $800 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ und im ganzen Bereich zwischen 300 und 400 nm (Farbglas UG 1, 2 nm) insgesamt nur $3\,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$. Bei dieser geringen Intensität blieb der UV-Bereich für die Anthocyansynthese der Gewebekulturen und Keimlinge von Haplopappus unwirksam.

Versuche mit $50\,000$ bis $90\,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$, die die Ermittlung des Wirkungsspektrums für diesen Bereich ergaben, wurden an einer Bestrahlungsanlage mit einer $2,5 \text{ kW}$ Xenon-Hochdrucklampe (Osram XBO) ausgeführt. Die Anlage wurde im Botanischen Institut der Liebig-Universität Giessen entwickelt und errichtet (RASCHKE 1967) und stand für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Bestrahlung erfolgte bei den Wellenlängen 351 nm , 372 nm , 397 nm , 404 nm und für den sichtbaren Bereich des Spektrums bei 441 nm , 480 nm , 660 nm und 735 nm (Filter UV-IL, DAL und Farbgläser UG, OG und RG der Firma Schott und Genossen).

ERGEBNISSE

a. Gewebekulturen von Haplopappus gracilis

I. Variabilität der Gewebe

Da in Gewebekulturen von Haplopappus gracilis Veränderungen der Genomzahl auftreten können (REINERT und TORREY 1961), mußten sie zunächst auf Variabilität bezüglich ihrer Fähigkeit zur Anthocyanbildung hin untersucht werden.

Im Folgenden werden Gewebekulturen als ein Stamm bezeichnet, wenn sie aus einem Teil eines Keimlings hervorgegangen sind. Eine Gruppe umfaßt die Gesamtheit aller Gewebe eines Stammes, die am selben Tag übertragen worden sind, also Gewebe gleichen physiologischen "Alters".

1. Beobachtungen an Gewebekulturen verschiedener Stämme

An Gewebekulturen von Haplopappus gracilis, die im Weißlicht bei einer täglichen Lichtperiode von 12 Stunden und bei einer Intensität von $6\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ wuchsen, konnte festgestellt werden, daß Kalli, die aus dem Sproß von verschiedenen Pflanzen stammten, unterschiedlich reagierten. Einige waren stark gefärbt, andere überhaupt nicht. Die meisten enthielten eine Anzahl anthocyanhaltiger Zellaggregate, die über die Oberfläche verstreut lagen.

Aus zwei Kalli, von denen der eine stark, der andere wenig anthocyanhaltig war, wurden im Verlauf eines Jahres zwei Stämme gezogen, die beide im Dunkeln bei 28°C völlig pigmentfrei waren.

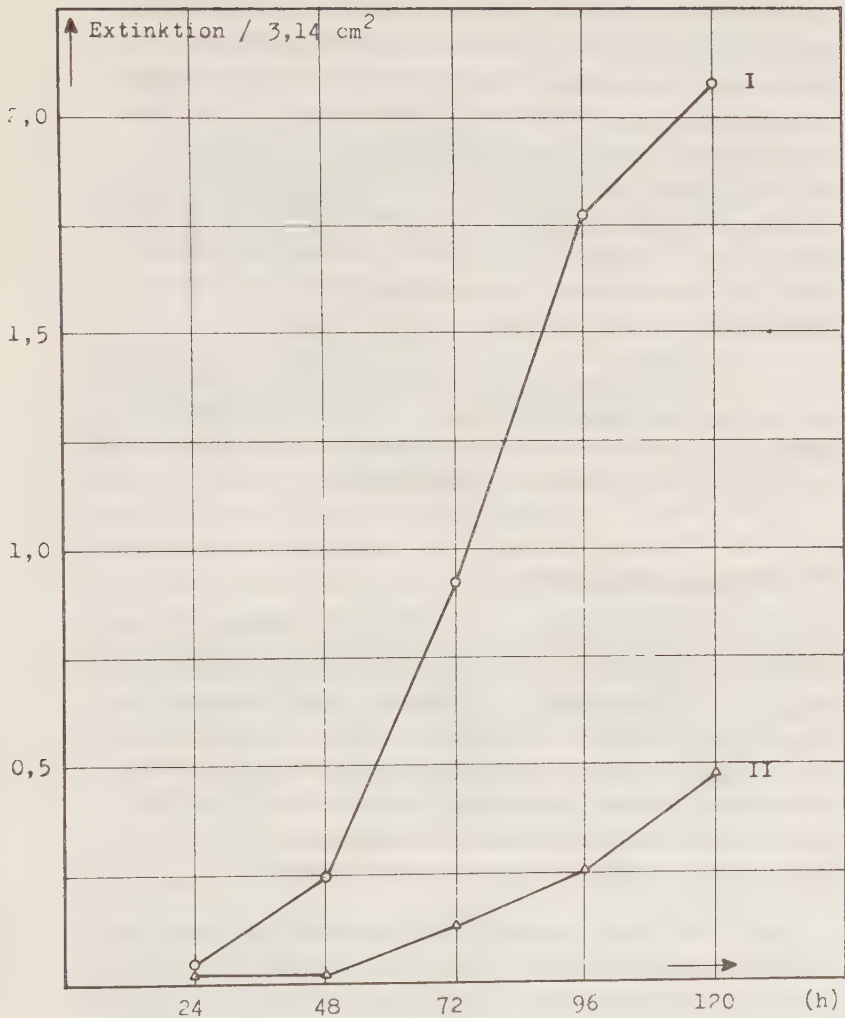


Abbildung 7: Unterschiedliche Reaktionsfähigkeit der Gewebe verschiedener Stämme von *Haplopappus gracilis*. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Versuchen, die Ordinate zeigt die Extinktionswerte/ $3,14 \text{ cm}^2$ Gewebe, die Abszisse die Dauer der Bestrahlung in Stunden. Die Intensität betrug $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$, die Temperatur war 28°C .

Die Reaktionsfähigkeit der beiden Stämme bei einer Bestrahlung mit Blaulicht von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ erwies sich als sehr unterschiedlich. Der zu Beginn der Kultivierung beobachtete Unterschied blieb auch während der langen Dunkelbehandlung der Gewebe erhalten. Waren die Zellen des einen Stammes nach 48 Stunden bereits gefärbt, so begannen die des anderen mit der Pigmentbildung erst 24 Stunden später. Auch der Anstieg des Anthocyangehaltes war unterschiedlich in den Kulturen beider Stämme.

In der Abbildung 7 ist die Reaktion der beiden genannten Haplopappusstämme auf die Dauer der Bestrahlung mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C graphisch wiedergegeben.

2. Gewebe eines Stammes

Da Gewebe verschiedener Stämme eine unterschiedliche Reaktionsfähigkeit aufwiesen, konnten zur Ermittlung der Lichtabhängigkeit der Anthocyansynthese nur Kulturen eines Stammes verwendet werden. Innerhalb dieses Stammes mußte untersucht werden, wie sich verschiedene Gruppen verhalten, und ob das Alter während der vierwöchigen Übertragungsperiode eine Wirkung auf die Reaktion des Gewebes ausübt.

Aus dem Stamm A wurde die Gruppe A_1^1 isoliert und ein Jahr lang unter gleichen Bedingungen im Dunkeln bei 20°C weitergezogen. Nach einem halben Jahr fand die Abtrennung von A_1^2 aus A_1^1 statt. A_1^2 wächst seit diesem Zeitpunkt ebenfalls im Dunkeln, aber bei einer Temperatur von 24°C .

Proben von A, A_1^1 und A_1^2 wurden 96 Stunden bei 28°C und $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ im Blaulichtfeld bestrahlt. Nach dieser Behandlung war die Oberfläche des Gewebes

gleichmäßig und intensiv ausgefärbt. Wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, zeigten die Gruppen einheitliche Reaktion.

Die hohen P-Werte zeigen deutlich, daß die Grenzen eines Stammes unter den gegebenen Bedingungen, bei hoher Temperatur und Intensität sowie langer Bestrahlungsdauer einheitlich reagieren (siehe Tabelle IV).

Tabelle IV: Vergleich der Reaktion verschiedener Gruppen eines Stammes von <i>Haplopappus gracilis</i>		
Das Gewebe der Gruppen A, A_1^1 und A_1^2 wurde 96 Stunden bei 28°C und 12 750 erg/cm ² sec bestrahlt. Gemessen wurde die Extinktion der Extrakte in 1 cm Küvetten nach einer Verdünnung auf 20 ml gegen die Kontrollen. E = Extinktion der Proben, K = Extinktion der Dunkelkontrolle gegen HCl-Propanol, E_m = Mittelwert der Extinktion einer Gruppe, V.K. = Variationskoeffizient.		
Gruppe A	Gruppe A_1^1	Gruppe A_1^2
E = 0,458 E = 0,455 E = 0,374 E = 0,460 E = 0,525 E = 0,480 E = 0,547	E = 0,578 E = 0,572 E = 0,534 E = 0,460	E = 0,525 E = 0,547 E = 0,480
Dunkelkontrollen: K = 0,004 K = 0,006 K = 0,005		
Mittelwert: E_m = 0,471 E_m = 0,536 E_m = 0,517		
Variationskoeff.: V.K. = 11,4% V.K. = 10,0% V.K. = 6,5%		
Signifikanz der Ergebnisse:		
Für A, A_1^1 ist P 0,05; für A_1^1 , A_1^2 beträgt P 0,5		

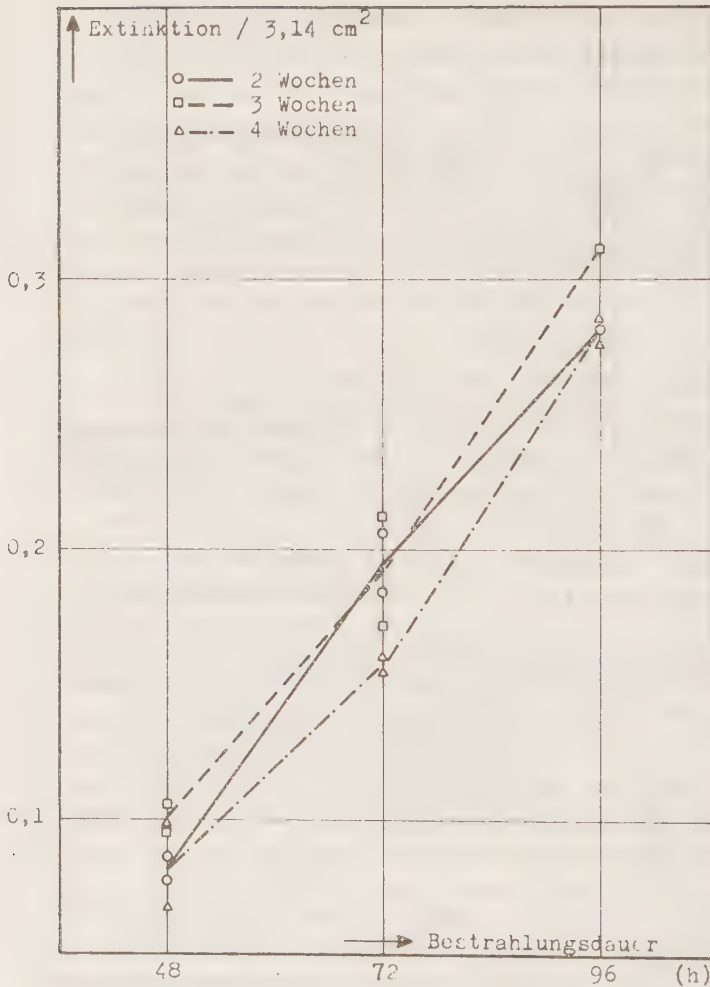


Abbildung 8: Reaktion der Gewebe verschiedenen Alters innerhalb der vierwöchigen Übertragungsperiode. Zwei, drei und vier Wochen altes Gewebe von Haplopappus wurde auf seine Reaktionsfähigkeit geprüft. Die Kulturen waren einer 48, 72 und 96-stündigen Lichtperiode bei einer Intensität von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ ausgesetzt (28°C). An die Lichtperiode schloß sich eine 24-stündige Dunkelbehandlung an. Ordinate: Extinction/ $3,14\text{ cm}^2$, Abszisse: Dauer der Bestrahlung. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

Weitere Versuche zur Variabilität der Gewebe eines Stammes sollten die Reaktionen von Kulturen verschiedenen Alters zeigen. Dazu wurden zwei, drei und vier Wochen altes Gewebe einer Gruppe jeweils 48, 72 und 96 Stunden lang mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt und anschließend 24 Stunden im Dunkeln gehalten.

Diese Versuche sind in der Abbildung 8 graphisch dargestellt. Sie wurden im Abstand von jeweils einer Woche ausgeführt und ergaben, daß das Alter einer Kultur innerhalb einer Übertragungsperiode keinen Einfluß auf die Synthesefähigkeit der Gewebekulturen von Haplopappus ausübt.

3. Wahl der Bezugsgröße

Beobachtungen an bestrahltem Haplopappusgewebe zeigten, daß die Anthocyansynthese nur in den obersten Zellschichten abläuft. Damit ergab sich eine Beziehung zwischen den Größe der bestrahlten Fläche und dem Ausmaß der Anthocyansynthese.

Versuche, in denen bei konstanter Oberfläche das Gewicht des eingepfropften Gewebes variierte, bewiesen, daß zwischen dem Gewicht der verwendeten Menge Gewebe und der gebildeten Anthocyanmenge kein Zusammenhang bestand. Gewebekalli von unterschiedlichem Gewicht wurden auf einer konstanten Fläche von $3,14\text{ cm}^2$ (Glasring $\varnothing = 2\text{ cm}$) verstrichen und 96 Stunden lang bestrahlt. Bei Bezugnahme auf das Gewicht zeigte sich nach Umrechnung der Extinktionswerte auf $0,1\text{ g}$ Gewebe deutlich, daß zwischen der Gewebemenge und der Menge des gebildeten Farbstoffs keine Korrelation besteht. Die Versuchsergebnisse sind in der

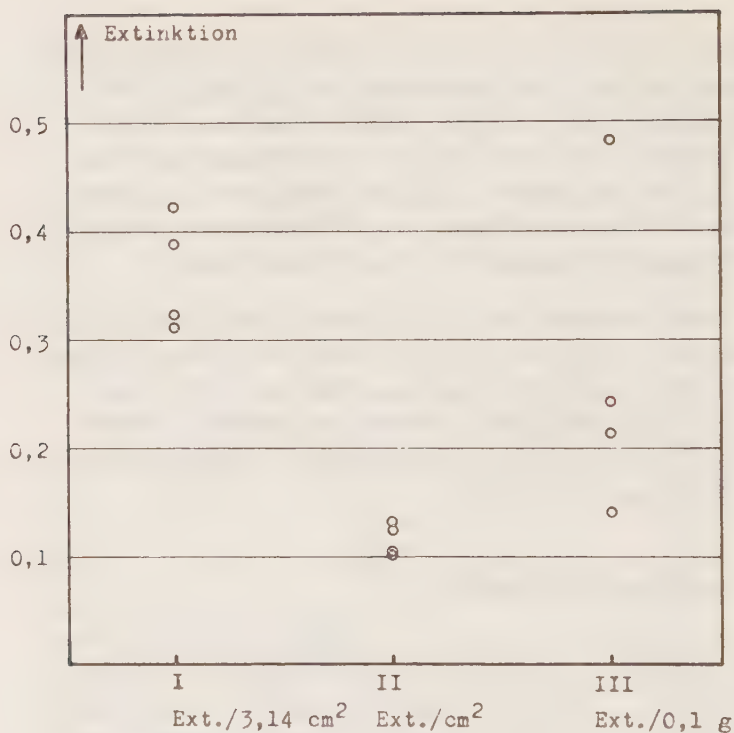


Abbildung 9: Korrelation zwischen der Anthocyanmenge und der Größe der bestrahlten Fläche bzw. der Menge des eingepfzten Haplopappusgewebes.

Bestrahlt wurde 96 Stunden mit Blaulicht der Intensität $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bei 28°C . Die Oberfläche der bestrahlten Gewebe wurde mit einem Glasring ($\varnothing = 2 \text{ cm}$) konstant gehalten. Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Versuchen. Die Gewebemengen sind in Tabelle V angegeben. Ordinate: Extinktion; Abszisse (ohne Dimension): I = gemessene Extinktion (= Extinktion/ $3,14 \text{ cm}^2$), II = Extinktion/ cm^2 der bestrahlten Fläche, III = Extinktion/ $0,1 \text{ g}$ eingepfztes Gewebe.

Tabelle V angeführt. Die Abbildung 9 gibt die Streuung der Werte bei der Wahl verschiedener Bezugsgrößen an.

Tabelle V: Korrelation zwischen der Anthocyanmenge und der Größe der bestrahlten Fläche bzw. der Menge des eingepfropften Haplopappusgewebes			
Verschiedene Mengen Gewebe wurden auf einer Fläche von $3,14 \text{ cm}^2$ verstrichen und 96 Stunden lang bei $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ und einer Versuchstemperatur von 28°C bestrahlt. Gemessen wurde die Extinktion nach Verdünnung der Extrakte auf 20 ml in 1 cm Küvetten gegen die Dunkelkontrolle. Umrechnung der Extinktionswerte ergab für die Bezugsgröße 1 cm^2 eine Fehlerwahrscheinlichkeit <u>V.K. = 13,5%</u> und für 0,1 g Gewebe <u>V.K. = 55,1%</u>. Bei konstanter Oberfläche ergab sich für Gewicht und Extinktion ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von <u>$r = 0,00329$</u>.			
Gewicht (g)	gemessene Extinkt.	Extinkt./ cm^2	Extinkt./0,1 g Gew.
0,08	$E = 0,387$	$E = 0,123$	$E = 0,484$
0,17	$E = 0,422$	$E = 0,131$	$E = 0,242$
0,22	$E = 0,310$	$E = 0,100$	$E = 0,141$
0,15	$E = 0,322$	$E = 0,102$	$E = 0,214$
0,20	$K = 0,010$		
Mittelwerte	$E_m = 0,360$	$E_m = 0,114$	$E_m = 0,270$

Ein Versuch mit verschiedenen großen dem Licht ausgesetzten Flächen bei konstanter Gewebemenge bestätigte die obengenannten Versuchsergebnisse und bewies die direkte Abhängigkeit der Anthocyanmenge von der Größe der bestrahlten Fläche. Der Test wurde ebenfalls mit Glasringen durchgeführt, die Extinktionswerte sind in der Tabelle VI aufgeführt.

Tabelle VI: Abhängigkeit der Anthocyanmenge von der Oberfläche des bestrahlten Gewebes

Haplopappusgewebe war nach dem Verstreichen auf einer Fläche von $1,75 \text{ cm}^2$ (Ring $\varnothing = 1 \text{ cm}$) und $3,14 \text{ cm}^2$ (Ring $\varnothing = 2 \text{ cm}$) einer 48-stündigen Bestrahlung mit Blaulicht der Intensität $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bei 28°C ausgesetzt. Die Einwaage betrug in jeder Probe 150 mg. Anschließend an die Lichtperiode folgte eine 24-stündige Dunkelbehandlung. Gemessen wurde die Extinktion der Extrakte nach Verdünnung auf 20 ml gegen die Kontrolle (F = Fläche).

Extinktion F = $1,75 \text{ cm}^2$	Extinktion /cm ²	Extinktion F = $3,14 \text{ cm}^2$	Extinktion /cm ²
E = 0,074	E = 0,042	E = 0,139	E = 0,044
E = 0,084	E = 0,048	E = 0,129	E = 0,041
E = 0,085	E = 0,048	E = 0,140	E = 0,044
E = 0,080	E = 0,046	E = 0,135	E = 0,043
E = 0,079	E = 0,045	E = 0,152	E = 0,048
E = 0,075	E = 0,042	E = 0,129	E = 0,041
Dunkelkontrolle:			
K = 0,005		K = 0,007	

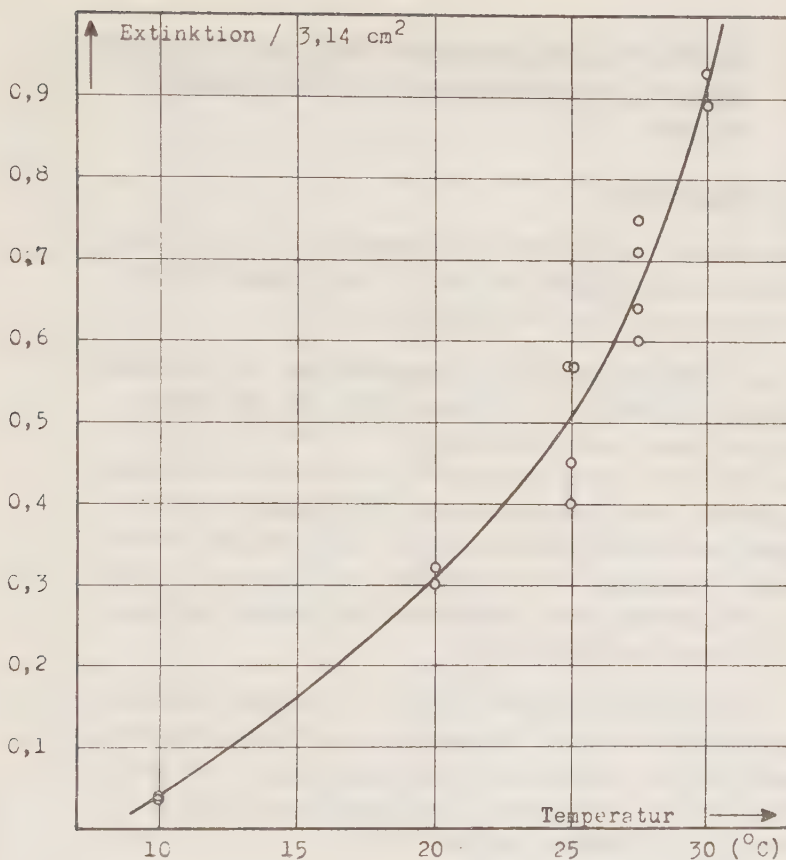


Abbildung 10: Abhängigkeit der Anthocyansynthese von der Temperatur während der Bestrahlung für Gewebekulturen.

Das Gewebe war einer 48-stündigen Bestrahlung mit 11 000 erg/cm² sec (Blaulicht) bei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Die Mittelwerte aus zwei und vier Versuchen sind angegeben. Die Ordinate gibt die Extinction/3,14 cm², die Abszisse die Temperatur während der Bestrahlung in °C an.

II. Einfluß von Temperatur und Dauer der Bestrahlung auf die Anthocyansynthese der Gewebekulturen

1. Temperatur

Die Temperatur während der Bestrahlung hatte einen wesentlichen Einfluß auf die Anthocyansynthese in Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis*.

Die Abhängigkeit der Pigmentbildung von der Temperatur während der Lichtgabe wurde im Blaulichtfeld bei konstanter Intensität von $11\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ und einer Bestrahlungsdauer von 48 Stunden untersucht. Eine Temperatur von 10°C hemmte die Anthocyanbildung völlig und bei 30°C traten erhebliche Schädigungen des Gewebes auf. Innerhalb dieser Grenzen bestand eine Förderung der Pigmentsynthese mit steigender Temperatur.

Als besonders günstig erwies sich eine Versuchstemperatur von 28°C . Die Ausbeute an Farbstoff war hoch und das Gewebe noch nicht geschädigt. Deshalb wurde für alle Versuche eine Temperatur von 28°C während der Bestrahlung gewählt.

Die Temperaturabhängigkeit der Anthocyanbildung in Gewebekulturen von *Haplopappus* ist in der Abbildung 10 dargestellt.

2. Dauer der Bestrahlung

Bestrahlung mit hoher Intensität ($12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$) führte bei konstanter Temperatur von 28°C nach einer Verzögerungsphase zu einem linearen Anstieg des Pigmentgehaltes im Gewebe. Nach einer Blaulichtbehandlung von 5 Tagen Dauer war die Sättigung erreicht (siehe Seite 37, Abbildung 12).

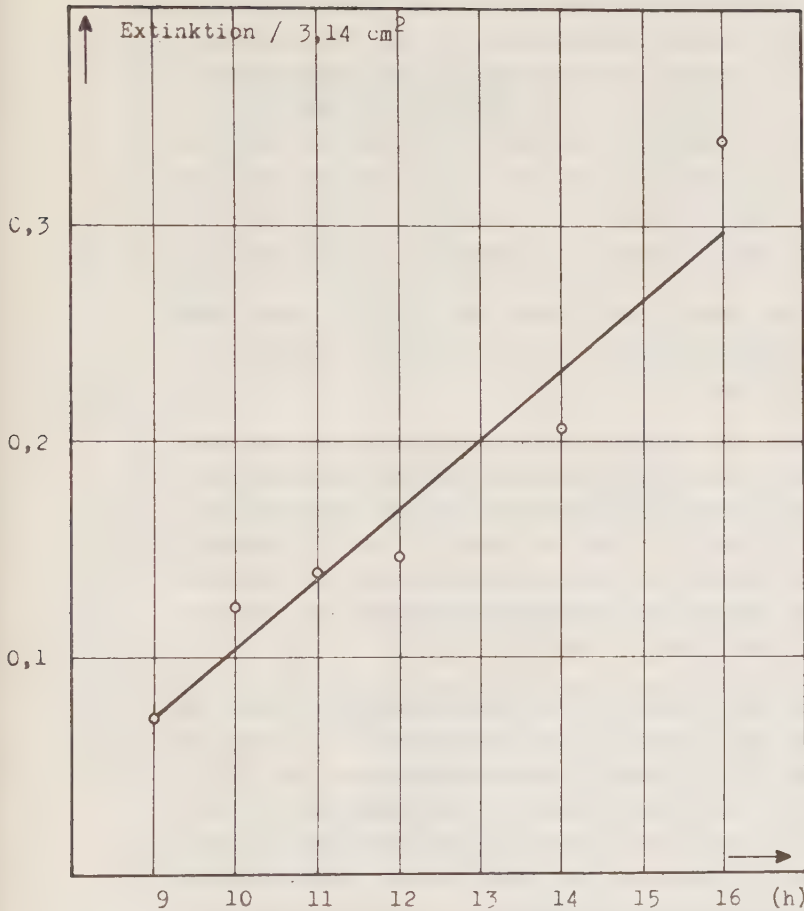


Abbildung 11: Ermittlung der Präinduktionsdauer der Anthocyan-synthese von Haplopappusgewebekulturen.

Das Gewebe wurde 9 bis 16 Stunden einer Blaulichtbestrahlung von $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bei 28°C ausgesetzt. Anschließend an die Lichtperiode folgte eine 24-stündige Dunkelbehandlung ebenfalls bei 28°C . Es sind die Mittelwerte aus drei Versuchen angegeben. Die Extinktionswerte der Dunkelkontrollen sind $K = 0,062$, $K = 0,058$ und $K = 0,062$. Die Ordinate gibt die Extinktion/ $3,14 \text{ cm}^2$ bestrahltes Gewebe, die Abszisse die Dauer der Bestrahlung in Stunden an.

Die Biosynthese des Anthocyans der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* verlief in drei Abschnitten, von denen nur die beiden ersten lichtabhängig waren. Der erste Teil, die "Präinduktionsphase", ist als diejenige Zeitspanne zu verstehen, die als Bestrahlungsdauer nicht ausreicht, um in einer anschließenden Dunkelperiode Pigmentbildung herbeizuführen. Erst während fortdauernder Bestrahlung erlangt das Gewebe in der "Induktionsphase" die Fähigkeit zur Anthocyansynthese. Im Anschluß daran kann die Pigmentbildung im Dunkeln vor sich gehen ("Dunkelphase").

Unter den obengenannten Bedingungen betrug die Präinduktionsdauer 9 Stunden und die Induktionsperiode, die bis zum ersten Auftreten des Pigments gemessen wurde, war nach weiteren 16 bis 17 Stunden abgeschlossen. Die daran anschließende Dunkelphase bis zur Beendigung der Reaktion betrug 16 Stunden (siehe Abbildung 15, Seite 43).

Zur Ermittlung der Präinduktionsdauer wurde das Gewebe mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei der üblichen Versuchstemperatur von 28°C bestrahlt und anschließend 24 Stunden lang im Dunkeln gehalten. Das Auftreten von Anthocyan nach 9 Stunden Lichtgabe und 24-stündiger Dunkelbehandlung war makroskopisch gut zu erkennen. Wegen der geringen Ausbeute an Farbstoff ließ sich der Unterschied zwischen der Extinktion der Dunkelkontrollen und der 9 Stunden bestrahlten Proben und damit das Erscheinen von Pigment statistisch nicht sichern.

Die graphische Darstellung von der Ermittlung der Präinduktionsdauer gibt die Abbildung 11. Bei geringer Bestrahlungsdauer sind die Schwankungen der Extinktionswerte beträchtlich. Hier machen sich

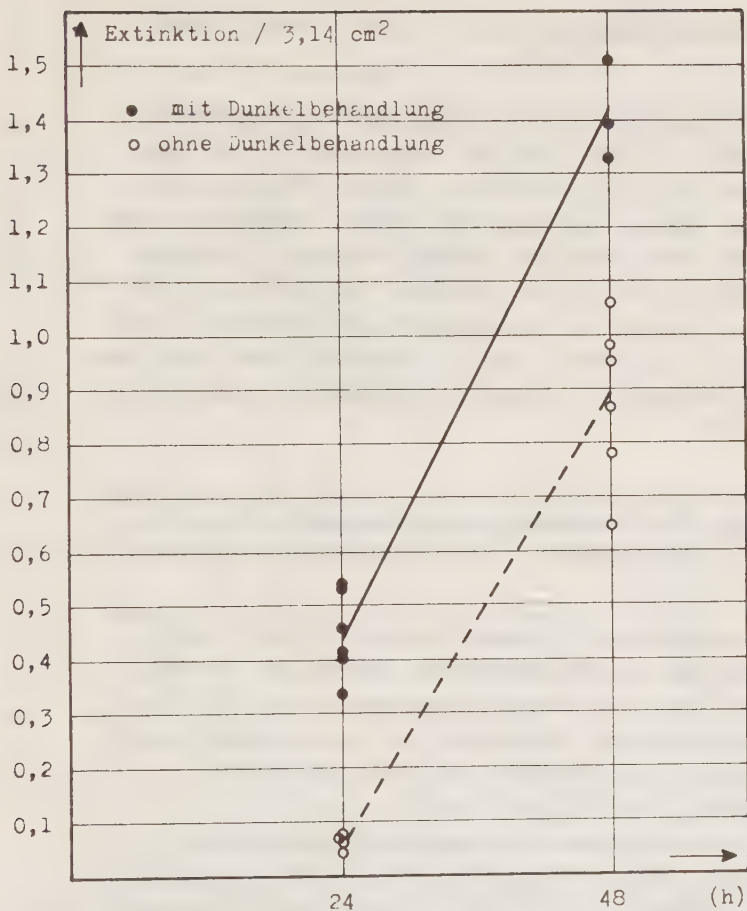


Abbildung 12: Fortdauer der Anthocyanbildung im Dunkeln nach vorhergehender Bestrahlung mit Blaulicht.

Die Gewebeproben wurden 24 und 48 Stunden mit Blaulicht der Intensität $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bestrahlt (28°C) und zum Teil sofort extrahiert, zum anderen weitere 24 Stunden im Dunkeln belassen. Es sind die Einzelwerte aus zwei Versuchen angegeben. Die Ordinate zeigt die Extinktion/ $3,14 \text{ cm}^2$, die Abszisse die Dauer der Bestrahlung in Stunden.

geringfügige Unterschiede im Gewebe stark bemerkbar.

Im folgenden Versuch wurde Haplopappusgewebe wiederum mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt. Nach 24 Stunden entnommene Proben sind zum Teil sofort extrahiert worden und verblieben zum anderen weitere 24 Stunden im Dunkeln. Das gleiche geschah mit Kulturen, die sich 48 Stunden im Bestrahlungsraum befanden. Dabei stellte sich heraus, daß die Synthese auch nach längerer Lichtgabe im Dunkeln fort dauert (siehe Abbildung 12).

Tabelle VII: Fortdauer der Anthocyansynthese im Dunkeln anschließend an die Bestrahlung mit Blaulicht

Die Induktion zur Pigmentbildung erfolgte durch Bestrahlung mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$, die Versuchstemperatur war 28°C . Gemessen wurde die Extinktion in 5 cm Küvetten nach Verdünnung der Extrakte auf 10 ml gegen HCl-Propanol.

Der Unterschied zwischen den Extinktionswerten für 24-stündige Bestrahlung ohne Dunkelbehandlung und 24 Stunden Licht + 24 Stunden Dunkel ist mit $P < 0,0027$ signifikant.

24 h Licht	24 h Licht +24 h Dunkel	48 h Licht	48 h Licht +24 h Dunkel
E = 0,062 E = 0,066 E = 0,077 E = 0,045	E = 0,457 E = 0,336 E = 0,525 E = 0,538 E = 0,412 E = 0,400	E = 0,780 E = 0,865 E = 1,060 E = 0,950 E = 0,980 E = 0,645	E = 1,327 E = 1,508 E = 1,390
Dunkel- kontrolle:	K = 0,098	E = 0,042	E = 0,060

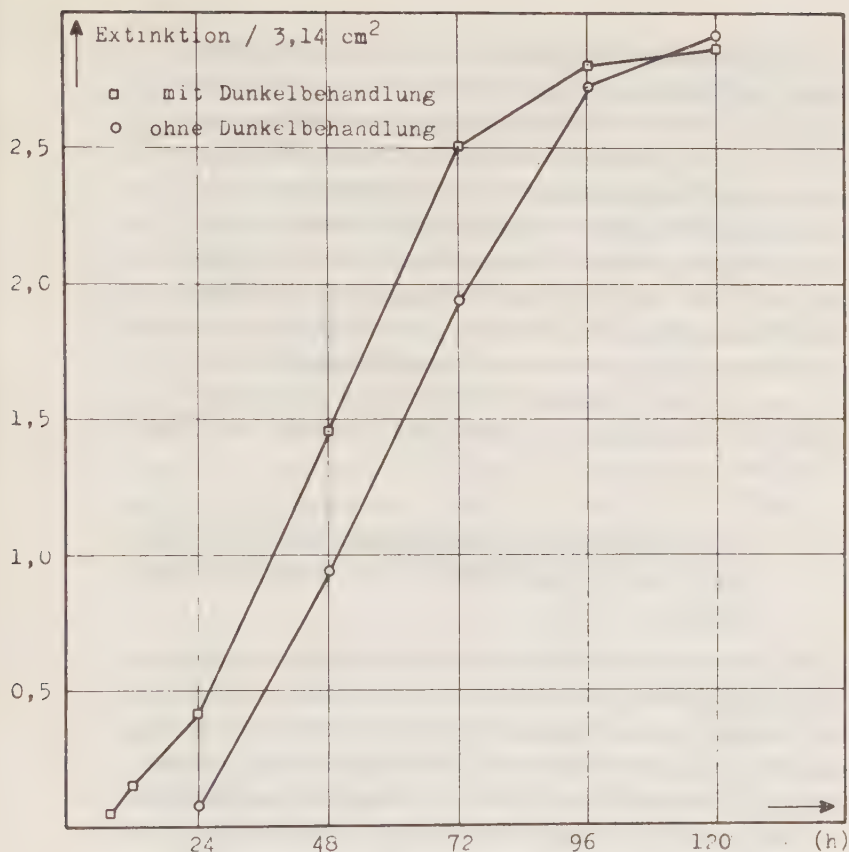


Abbildung 13: Nachbildung von Anthocyan anschließend an eine Lichtperiode bis zur Sättigung.

Das Haplopappusgewebe wurde 12 bis 120 Stunden mit Blaulicht der Intensität $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt, zum Teil sofort anschließend an die Lichtbehandlung extrahiert, zum Teil weitere 24 Stunden im Dunkeln belassen. Die Ordinate gibt die Extinktion der Proben, die Abszisse die Dauer der Bestrahlung in Stunden an. Es sind die Mittelwerte aus drei Versuchen angeführt.

Aus der Abbildung 13 geht hervor, daß die Nachbildung des Anthocyans im Dunkeln bis zur Sättigung nach einer vier- bis fünftägigen Bestrahlung andauerte. Die jeweils dabei entstehende Anthocyanmenge blieb nahezu konstant. Ein hemmender Einfluß des Lichtes auf die Bildungsphase konnte nicht festgestellt werden. Die beiden Kurven verlaufen parallel und treffen im Sättigungspunkt zusammen. Eine Hemmwirkung des Lichtes in der Bildungsphase des Anthocyans würde eine starke Divergenz der Kurven in dem linearen Abschnitt der Pigmentbildung hervorrufen und ein Zusammentreffen verhindern.

III. Temperaturempfindlichkeit und Lichtbedürftigkeit der Anthocyansynthese in ihren einzelnen Phasen

Die Anthocyansynthese in Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* ist in ihrem zeitlichen Verlauf im vorigen Kapitel genau verfolgt worden. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß nicht alle Phasen gleich lichtabhängig sind. Im Folgenden wird die Abhängigkeit der Pigmentbildung in den einzelnen Abschnitten auf Temperatur- und Lichtbedürftigkeit hin untersucht.

1. Präinduktionsphase

Als eigentlicher energie- und temperaturempfindlicher Teil der Anthocyansynthese erwies sich die Phase der Präinduktion.

Bei der Prüfung der Intensitätsabhängigkeit der Reaktion zeigte sich, daß bei einer Bestrahlung mit $2\,550\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ (Neutralglas im Blaulichtfeld) die Präinduktion erst nach 48 Stunden abgeschlossen war. Die anschließend nach 5-stündiger Induktionszeit und weiterer 24 Stunden dauernden Dunkelbehandlung gebildeten Anthocyanmengen waren so gering, daß sie keine meßbaren Extinktionen ergaben. Die Pigmentbildung war aber makroskopisch gut zu erkennen. Bei noch geringerer Intensität, $1\,275\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ kam es auch nach 96-stündiger Lichtperiode nicht zur Induktion und Anthocyan synthese. Jedoch traten in einigen Fällen nach 48 Stunden einzelne gefärbte Zellaggregate auf. Blieben diese Proben länger im Bestrahlungsraum, so traten keine neuen pigmenthaltigen Zellen hinzu.

Die Abhängigkeit der Präinduktionsdauer von der Temperatur ist an Haplopappusgewebe beobachtet worden, das bei einer täglichen 12-stündigen Bestrahlung mit Weißlicht von $6\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ auch nach monatelanger periodischer Lichtgabe bei 24°C nicht imstande war, Pigment zu synthetisieren. Durch eine Temperaturerhöhung auf 28°C kam es im Gewebe unter sonst gleichen Bedingungen zur Induktion und der Farbstoff konnte gebildet werden.

2. Induktionsphase

In jedem Falle vergingen bis zum Auftreten des Anthocyan im Anschluß an die Präinduktionsphase noch weitere 16 bis 17 Stunden. Auch durch eine Bestrahlung mit monochromatischem Blaulicht (441 nm, DAL-Filter, Schott) der Intensität $90\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ (Xenon-Hochdrucklampe, siehe Seite 20) konnte diese Zeit nicht verringert werden. Die Dauer der

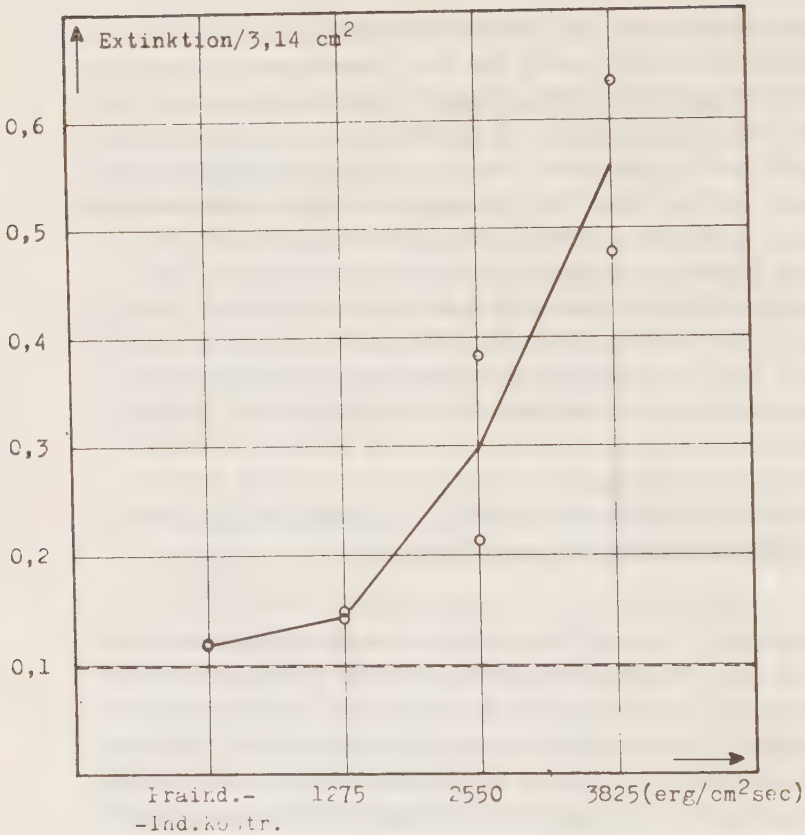


Abbildung 14: Intensitätsabhängigkeit der Anthocyan-synthese der Gewebekulturen in der Induktionsphase der Reaktion.

Das Gewebe war zunächst 12 Stunden Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C ausgesetzt und wurde anschließend 36 Stunden bei geringerer Intensität bestrahlt und weitere 48 Stunden im Dunkeln gehalten. Es sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen angegeben (Präinduktions-Induktions-Kontrolle = 8 Stunden Präinduktion + 4 Stunden Induktion bei $12\,750\text{ erg}$). Die Ordinate zeigt die Extinktion/ $3,14\text{ cm}^2$, die Abszisse die Intensität der Bestrahlung anschließend an die 12-stündige Lichtgabe bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$.

Biosynthese des Anthocyans der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* dauerte immer mindestens 25 bis 26 Stunden.

Die folgenden Versuche zeigen, daß die Induktion durch sehr geringe Energiezufuhr herbeigeführt werden konnte, wenn eine Präinduktion bei der hohen Intensität von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ und konstanter Temperatur von 28°C vorausgegangen war. In der Tabelle VIII sind die Extinktionswerte angegeben, die durch Bestrahlung der Gewebe im Blaulichtfeld (8 Stunden = Präinduktion) mit hoher Intensität und einer anschließenden Lichtperiode bei geringer Energiezufuhr erzielt worden sind.

Es wird deutlich, daß die Induktion anschließend an eine Vorbestrahlung mit hoher Intensität durch eine Energiezufuhr erreicht werden konnte, die allein nicht zur Präinduktion und damit auch nicht zur Induktion der Anthocyansynthese geführt hätte.

In dem Abschnitt der Induktion war die Anthocyan-synthese ebenso wie in der Phase der Präinduktion energieabhängig. Mit steigender Intensität nahm die Pigmentbildung zu. In der Abbildung 14 sind die Werte angegeben, die durch 12-stündige Bestrahlung mit $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ und anschließender geringer Energiezufuhr erzielt worden sind. In diesem Fall wurde die Induktion schon während der Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität gegeben, und die ermittelten Werte lagen bedeutend höher als die, die durch Induktion bei geringer Lichtenergie erzielt werden konnten (siehe Tabelle VIII, Seite 42). Die Intensitätsabhängigkeit der Anthocyansynthese in der Induktionsphase ist in der Abbildung 14 graphisch wiedergegeben.

Tabelle VIII: Induktion durch geringe Intensität
im Anschluß an eine Präinduktion bei 12 750 erg/
cm² sec

Auf eine 8-stündige Präinduktion bei 12 750 erg/cm² sec und 28°C folgte eine Bestrahlung mit geringer Intensität (36 Stunden) durch Abdecken der Petrischalen mit Neutralgläsern. Anschließend wurde das Gewebe 48 Stunden im Dunkeln gehalten. Die Extinktion wurde nach Verdünnung der Extrakte auf 10 ml in 5 cm Küvetten gemessen (gegen HCl-Propanol). Die "Präinduktionskontrollen" sind Proben, die 8 Stunden bei 12 750 erg/cm² sec (Präinduktion) bestrahlt worden und anschließend 96 Stunden im Dunkeln belassen worden sind.

Präinduktions- kontrolle	1275 erg/ cm ² sec	2550 erg/ cm ² sec	3825 erg/ cm ² sec
E = 0,068	E = 0,113	E = 0,115	E = 0,300
E = 0,074	E = 0,116	E = 0,112	E = 0,340
E = 0,082	E = 0,118	E = 0,115	E = 0,410
	E = 0,104		
E _m = 0,074	E _m = 0,113	E _m = 0,114	E _m = 0,350
Dunkelkontrolle:			
K = 0,073			

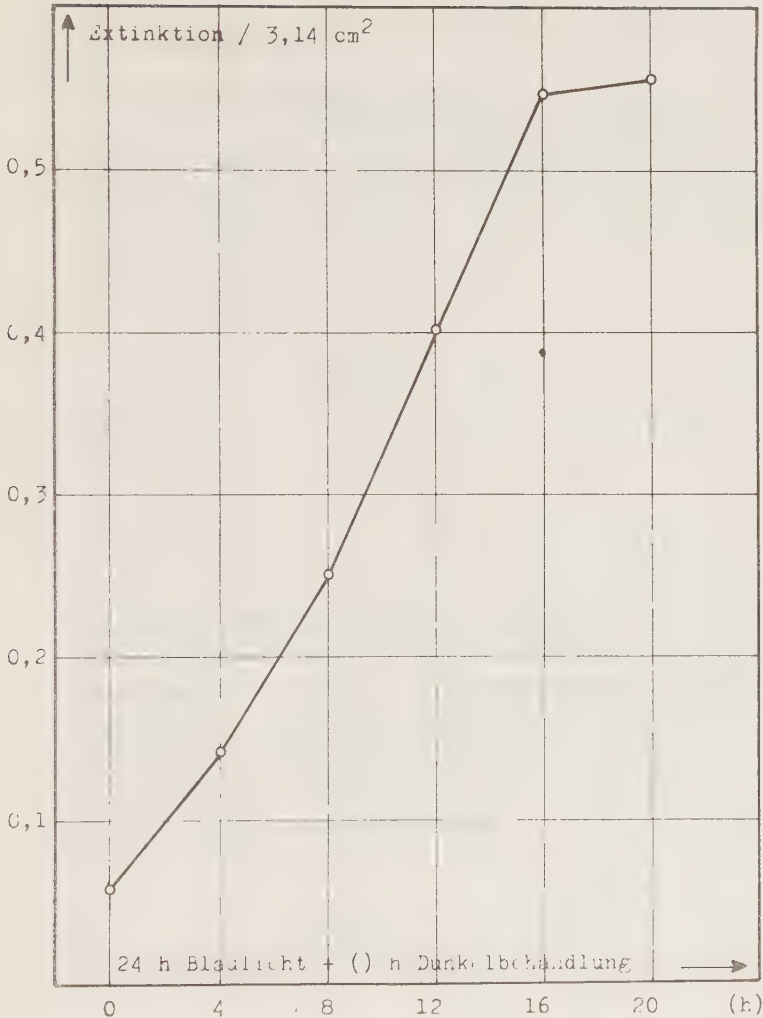


Abbildung 15: Dauer der Bildungsphase bei einer konstanten Temperatur von 28°C.

Das Gewebe wurde zunächst 24 Stunden mit Blaulicht der Intensität 12 750 erg/cm² sec bei 28°C bestrahlt und anschließend bei derselben Temperatur im Dunkeln gehalten. Alle vier Stunden wurden Proben entnommen und extrahiert. Die Mittelwerte aus drei Versuchen sind in der Darstellung angegeben. Die Ordinate zeigt die Extinktion/3,14 cm², die Abszisse die Dauer der Dunkelbehandlung in Stunden.

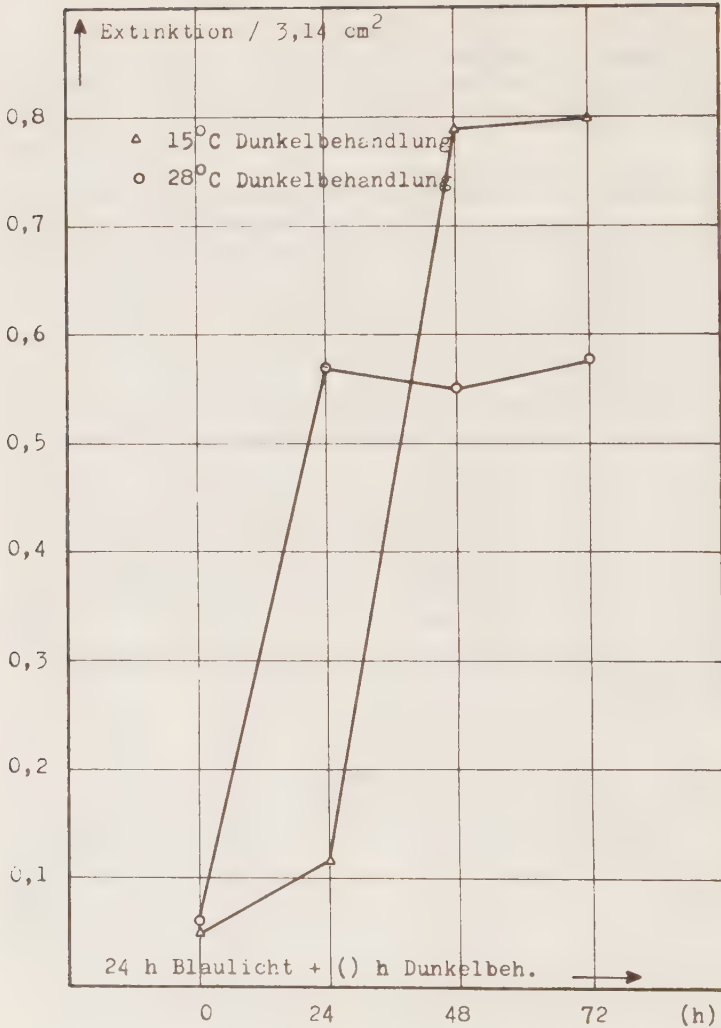


Abbildung 16: Abhängigkeit der Dauer der Dunkelphase von der Temperatur und Förderung der Synthese durch niedrige Temperaturen während der Dunkelperiode. Anschließend an eine 24-stündige Bestrahlung mit Blaulicht der Intensität 12 750 erg/cm² sec bei 28°C wurde das Gewebe 0 bis 72 Stunden im Dunkeln bei 15 und 28°C belassen. Die Ordinate zeigt die Extinktion/3,14 cm², die Abszisse die Dauer der Dunkelbehandlung in Stunden.

3. Bildungsphase

Die Bildung des Anthocyans erfolgte anschließend an eine Induktion im Blaulicht hoher Intensität im Dunkeln ebenso wie bei fortdauernder Bestrahlung. Die auf die Photoreaktion folgenden Schritte in der Biosynthesekette des Anthocyans erwiesen sich damit als lichtunabhängig (siehe Tabelle VII und Abbildungen 12, 13).

Nach einer 24 Stunden dauernden Bestrahlung mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ stieg bei einer Versuchstemperatur von 28°C der Anthocyangehalt des Gewebes im Dunkeln anschließend an die Lichtperiode linear an, bis nach etwa 16 Stunden die Reaktion ausgelaufen war (siehe Abbildung 15).

Die Dauer der Bildungsphase war temperaturabhängig und stieg mit sinkender Temperatur an. Schloß sich an eine Bestrahlung bei 28°C eine Dunkelbehandlung bei 15°C an, so dauerte die Bildungsphase 48 Stunden. Die Reaktion benötigte 48 Stunden um auszulaufen. Die Kältebehandlung rief eine 30%-ige Förderung der Anthocyansynthese in der Dunkelphase hervor (siehe Abbildung 16).

Die Mittelwerte aus drei Versuchen sind angegeben. Die Mehrsynthese nach 72-stündiger Kältebehandlung (gegenüber 72 h bei 28°C) ist mit einem $P < 0,0005$ gesichert.-)

IV. Abhängigkeit der Anthocyansynthese vom Nährmedium

Im Rahmen der Versuche zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Anthocyansynthese der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* wurden die einzelnen Komponenten des Nährbodens auf ihren Einfluß hin untersucht.

1. Zucker

Das White'sche Medium, auf dem das *Haplopappus*-Gewebe angezogen und kultiviert worden war, enthielt eine für das Wachstum der Kulturen optimale Konzentration von 2 % Saccharose. Eine Variation des Zuckergehaltes im Nährboden zwischen 0,5 und 4% beeinflusste die Pigmentbildung nicht. Wurde dagegen die Saccharose durch Mannit ersetzt, so verlor das Gewebe sofort seine Synthesefähigkeit, gewann sie jedoch bei Zuckerfütterung ebenso schnell wieder zurück (siehe Tabelle IX).

Die Anthocyansynthese der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* lief weitgehend unabhängig von der Zuckerkonzentration des Nährmediums ab. Da die Gewebe kein Chlorophyll enthielten und damit auch nicht zur Photosynthese befähigt waren, konnte aber damit auch keine Anthocyansynthese ohne Zugabe eines chemischen Energielieferanten im Gewebe vorsichgehen. *Haplopappus*kulturen waren aber in der Lage, Fruktose oder Glucose ebenso zu verwenden wie die bereits erwähnte Saccharose. In der Tabelle X werden diese Ergebnisse gezeigt.

Tabelle IX: Einfluß der Saccharosekonzentration auf
Die Anthocyansynthese und Hemmung durch Mannit

Haplopappusgewebe wurde in flüssigem Medium verschiedener Saccharosekonzentration auf einer Schüttelapparatur 3 Tage geschüttelt, abfiltriert, auf Agarboden verstrichen, 24 Stunden bestrahlt ($12\ 750\ \text{erg/cm}^2\ \text{sec}$, 28°C) und anschließend 24 Stunden im Dunkeln belassen. In mannithaltigem, flüssigem Medium wurde das Gewebe nur gespült und anschließend entweder (I) auf Saccharose- oder (II) mannithaltigem Agarboden verstrichen und wie oben beschrieben weiterbehandelt (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen die Kontrolle).

0,5 %	Saccharose 2 %	4 %	von Sacch. in Mannit	von Mannit in Sacch.
E = 0,5343	E = 0,490	E = 0,510	E = 0,065	E = 0,513
E = 0,498	E = 0,527	E = 0,527	E = 0,070	E = 0,487
E = 0,480	E = 0,530	E = 0,500	E = 0,075	E = 0,500
E = 0,500	E = 0,485	E = 0,473	E = 0,062	E = 0,491

Tabelle X: Die Wirksamkeit von Fruktose, Glucose und Saccharose bei der Bildung des Anthocyans

Haplopappusgewebe wurde in flüssigem Medium, das verschiedene Zucker in äquimolarer Lösung (0,06 Mol/l) enthielt, drei Tage lang auf einer Schüttelapparatur geschüttelt, abfiltriert, auf Agarboden, der den jeweiligen Zucker enthielt, verstrichen, 24 Stunden bestrahlt ($12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ Blaulicht, 28°C) und weitere 24 Stunden im Dunkeln belassen. Die Extinktion der Extrakte wurde nach Verdünnung auf 10 ml in 5 cm Küvetten gegen die Kontrolle gemessen.

Saccharose	Fruktose	Glucose
E = 0,500	E = 0,485	E = 0,490
E = 0,487	E = 0,470	E = 0,520
E = 0,479	E = 0,495	E = 0,505
E = 0,512	E = 0,520	E = 0,578
E = 0,500	E = 0,510	E = 0,490
E = 0,490	E = 0,498	E = 0,489
Dunkelkontrolle:		
K = 0,060	K = 0,075	K = 0,070

2. Nährsalze

Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis*, die auf einem modifizierten Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) angezogen und kultiviert worden sind, bildeten bei Bestrahlung mit Blaulicht kein Anthocyan (REINERT und ARDENNE unveröff.).

Von dem bisher verwendeten White'schen Nährboden unterscheidet sich dieses Medium allein durch die Zusammensetzung der anorganischen Salze. Dabei liegt

der Unterschied hauptsächlich im Nitratgehalt. In der Tabelle XI sind die Salze angegeben, die in den Nährmedien enthalten sind.

Tabelle XI: Vergleich der anorganischen Salze, die in 1 Liter White- bzw. Skoogmedium enthalten sind		
Salze	White	Skoog
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	289,0	-
KCl	65	-
KNO_3	80	1900
Na_2SO_4	200	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	19	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6,6	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,7	10,6
H_3BO_3	-	8,6
KJ	1,5	6,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	738	370
NH_4NO_3	-	1650
KH_2PO_4	12,5	170
CaCl	-	440
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	27,8
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0,025
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	-	37,3
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,026	-

Die folgenden Versuche machen deutlich, daß die anorganischen Substanzen im Nährboden eine entscheidende Rolle bei der Anthocyanbildung der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* spielen.

Wurde das auf Skoog'schem Medium herangezogene und kultivierte Gewebe auf White'sches Medium über-

tragen, so erhielt es hierdurch nach einigen Kulturperioden die Fähigkeit, Anthocyan zu bilden. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, daß mit dem Wechsel von White- auf Skoogagar eine Wachstumsverminderung der Kulturen einherging. In der Tabelle XII sind diese Ergebnisse wiedergegeben.

Tabelle XII: Wechsel des Mediums und Auswirkungen auf die Anthocyan synthese und das Wachstum der Gewebekulturen		
Suspensionskulturen von Haplopappus wurden abfiltriert, verstrichen und 48 Stunden im Blaulichtfeld bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ und 28°C bestrahlt. I. Gewebe in flüssigem Whitemedium, II. in flüssigem Skoogmedium, III. Gewebe, das auf Skoogagar angezogen worden und in flüssiges White übertragen worden ist. Die Gewichtszunahmen (prozentuale Wachstumsrate in 14 Tagen) ist der Mittelwert aus 20 Messungen. Die Extraktion der Gewebe erfolgte sofort anschließend an die Bestrahlung (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen die Kontrolle).		
I. Gewebe auf White	II. Gewebe auf Skoog	III. Gewebe von White auf Skoog
E = 1,800	E = 0,028	E = 0,800
E = 1,500	E = 0,028	E = 0,750
E = 1,900	E = 0,022	E = 0,700
E = 1,750	E = 0,016	E = 0,780
E = 1,700	E = 0,024	E = 0,800
Dunkelkontrolle: K = 0,030	K = 0,035	K = 0,030
Wachstumsrate (14 Tage bei 28°C):		
250 %	2 000 %	450 %

Die Abhängigkeit der Anthocyansynthese vom Gehalt des Nährbodens an anorganischen Substanzen konnte durch eine Variation der Salze genauer bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß die Abwesenheit von Ammoniumnitrat und der geringe Anteil des Kaliumnitrates im White'schen Medium ein wesentlicher Faktor für die Pigmentbildung der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* auf diesem Nährboden darstellte.

Ein Zusatz von 165 mg Ammoniumnitrat zu 100 ml White'schem Agarboden, also die Menge, die im Skoog'schen Medium enthalten ist (siehe Tabelle XI), hemmte bereits nach 10 Tagen die Anthocyanbildung vollkommen. Wurde eine in Bezug auf den Stickstoff äquivalente Menge Kaliumnitrat (416 mg/100 ml Nährlösung) zugegeben, so war die Pigmentsynthese nach ebenfalls 10 Tagen zwar erheblich eingeschränkt, aber nicht völlig unterdrückt.

Durch Entzug des Stickstoffs konnte die Hemmung zum Teil wieder rückgängig gemacht werden. Ebenso, wie durch Umsetzen von Skoog- auf Whitemedium gewann dadurch das Gewebe die Fähigkeit zur Anthocyansynthese zurück. Hemmung und Aufhebung der Hemmung durch Zugabe und Entzug von Nitrat sind in der Tabelle XIII dargestellt.

Wie schnell das Nitrat in die Zellen aufgenommen werden und seine Wirkung entfalten konnte, zeigte sich, wenn dem Gewebe das Kalium- oder Ammoniumnitrat in flüssigem Medium zugegeben wurde. Blieben die Substanzen einige Stunden auf einer Schüttelapparatur mit dem Gewebe in intensivem Kontakt, so war bereits nach 12 Stunden die Anthocyansynthese gehemmt, und sie sank weiter mit längerer Einwirkungsdauer. Nach dreitägigem Wachstum der Gewebe-

Tabelle XIII: Hemmung der Anthocyansynthese durch Zugabe von Nitrat und Aufhebung der Hemmung durch Nitratentzug

Haplopappusgewebe auf Whiteagar wurde 48 Stunden lang im Blaulichtfeld bei $12\ 750\ \text{erg/cm}^2\ \text{sec}$ bestrahlt und anschließend sofort extrahiert. I. Gewebe auf normalem Whitemedium, II. Zugabe von $165\ \text{mg}/100\ \text{ml}\ \text{NH}_4\text{NO}_3$ (4 Wochen), III. Zugabe von $416\ \text{mg}/100\ \text{ml}\ \text{KNO}_3$ (4 Wochen), IV. Entzug des NH_4NO_3 (4 Wochen) und V. Entzug des KNO_3 (4 Wochen) durch Umsetzen auf normales Whitemedium. Die Extraktion erfolgte sofort anschließend an die Bestrahlung. Gemessen wurde die Extinktion der Extrakte in 5 cm Küvetten nach Verdünnung auf 10 ml gegen die Kontrolle.

I. Whitemedium	II. White + NH_4NO_3	III. White + KNO_3
E = 0,570	E = 0,045	E = 0,050
E = 0,535	E = 0,055	E = 0,055
E = 0,600	E = 0,055	E = 0,060
E = 0,610	E = 0,050	E = 0,090
E = 0,455	E = 0,045	E = 0,070
Dunkelkontrolle:		
K = 0,040	K = 0,045	K = 0,030
IV. Entzug von NH_4NO_3		V. Entzug von KNO_3
E = 0,092	E = 0,155	
E = 0,100	E = 0,195	
E = 0,085	E = 0,200	
E = 0,095	E = 0,220	
E = 0,105	E = 0,250	
Dunkelkontrolle:		
K = 0,048	K = 0,050	

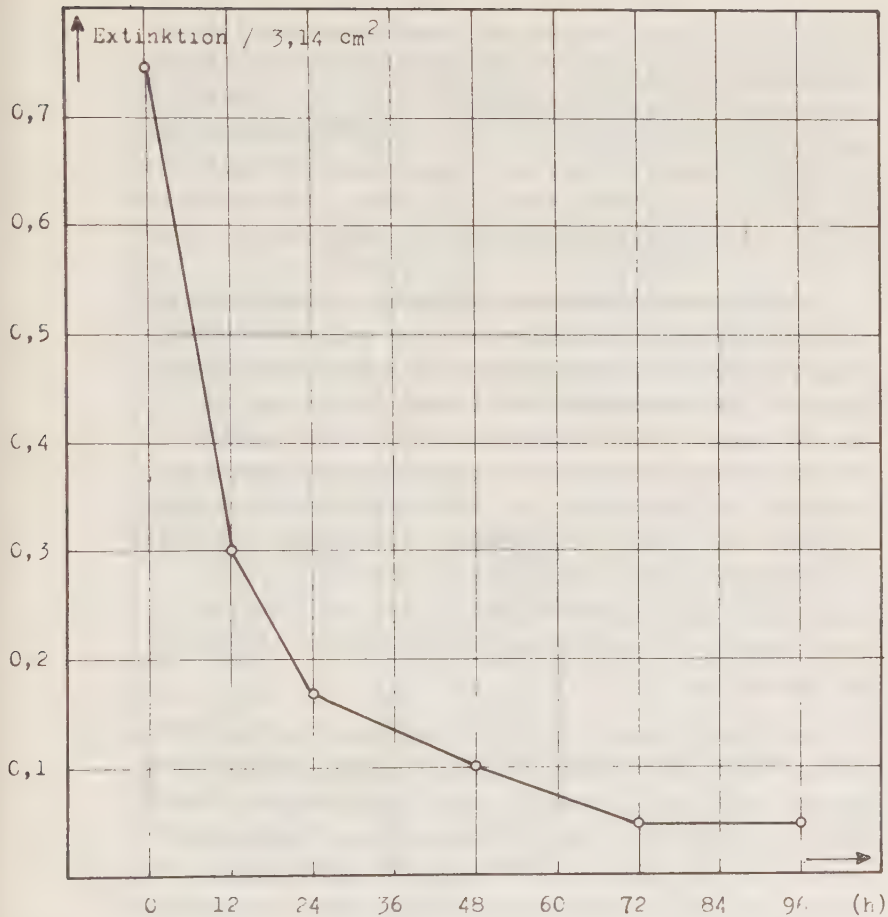


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Hemmwirkung des Ammonium-nitrates.

Haplopappusgewebe wurde vom normalen Whiteagar in flüssiges Whitemedium mit einem Zusatz von 165 mg/100 ml Nährlösung NH_4NO_3 gebracht und auf einer Schüttelapparatur geschüttelt. Nach 12, 24, 48 .. Stunden wurden Proben entnommen und 48 Stunden bei 12 750 erg/cm² sec im Blaulicht (28°) bestrahlt und sofort anschließend extrahiert. Die Ordinate zeigt die Ex-tinktion/3,14 cm², die Abszisse die Dauer der NH_4NO_3 -Einwirkung in Stunden. Die Kurve ergibt sich aus den Mittelwerten von 3 Versuchen.

kulturen in einem Medium mit Ammoniumnitrat (165 mg NH_4NO_3 auf 100 ml White'sche Nährlösung) war die Anthocyanbildung vollständig gehemmt. Das Gewebe wurde durch die Zugabe von Ammoniumnitrat nicht geschädigt. Es blieb hell und wuchs weiterhin gut. In der Abbildung 17 ist der sehr steile zeitliche Verlauf der Hemmwirkung graphisch dargestellt.

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß Haplopappusgewebe, das auf ammoniumhaltigem Whitemedium angezogen worden ist, auch nach längerer Bestrahlungsdauer (3 bis 6 Tage bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$) kein Anthocyan bilden konnte. Entzug des Nitrates führte auch hier zur Pigmentsynthese im Blaulicht. Die Anthocyanausbeute stieg mit der Zahl der Übertragungen. Erst wenn eine vollständige Verarmung an NH_4NO_3 erreicht war, entsprach die Anthocyansynthese dieser Kulturen der der Gewebe, die auf normalem Whitemedium angezogen worden waren.

Das Gewebe neuer Haplopappusstämme, das auf Whiteschem Nähragar mit einem Zusatz von Ammoniumnitrat kultiviert wurde, verhielt sich also ähnlich, wie Haplopappusgewebe, das auf Skoog'schem Nährmedium wuchs. In der Tabelle XIV sind die Extinktionswerte, die durch Entzug des NH_4NO_3 durch eine Reihe von Übertragungen auf normales White'sches Medium erzielt worden sind, angegeben.

Tabelle XIV: Anthocyanbildung neuer Haplopappus- stämme durch Entzug des Ammoniumnitrates			
Aus dem Hypokotyl junger etiolierter Haplopappus- keimlinge wurde auf White'schem Medium mit einem Zusatz von 165 mg/100 ml Nährlösung Gewebe angezo- gen. Ein Teil des Gewebes (I) wuchs weiter auf die- sem Medium, ein weiterer wurde auf normales White- medium übertragen (II). 4, 8 und 12 Wochen nach Entzug des Nitrates wurden die Gewebe in Petri- schalen verstrichen und 48 Stunden lang bei 12 750 erg/cm ² sec bestrahlt und sofort anschlie- ßend extrahiert (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen die Kontrolle).-			
I. White + NH ₄ NO ₃	II. 4 Wochen 8 Wochen 12 Wochen (nach Entzug des Nitrates)		
E = 0,022	E = 0,112	E = 0,225	E = 0,600
E = 0,030	E = 0,098	E = 0,195	E = 0,549
E = 0,025	E = 0,095	E = 0,190	E = 0,575
E = 0,020	E = 0,100	E = 0,200	E = 0,586
E = 0,020	E = 0,107	E = 0,215	E = 0,612
Dunkelkontrolle			
K = 0,030	K = 0,035	K = 0,030	K = 0,037

Wie aus der Tabelle XIV hervorgeht, hemmt Kaliumnitrat die Pigmentsynthese ebenso wie Ammoniumnitrat, wenn es in äquivalenten Mengen, bezogen auf den Stickstoff, zugegeben wurde. Die Hemmung durch KNO₃ war jedoch nicht so stark, wie die durch NH₄NO₃ hervorgerufene. Dieser Befund konnte durch einen Versuch bestätigt werden, in dem White'schem Medium Kaliumnitrat einerseits und Ammoniumnitrat andererseits in steigender Konzentration zugesetzt worden war. Jedoch

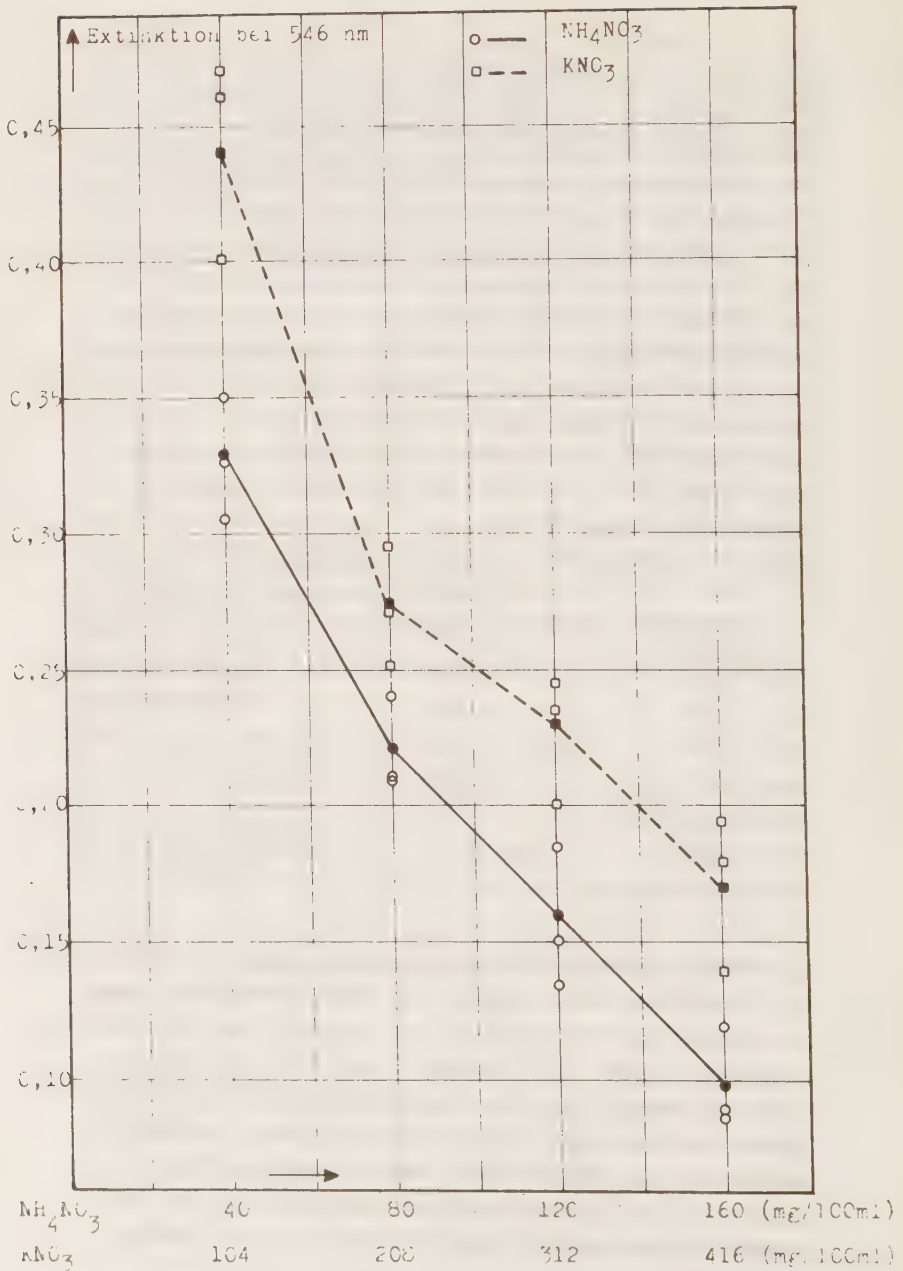


Abbildung 18: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Nitrate.

Das Gewebe wurde 48 Stunden der Einwirkung verschiedener Konzentrationen NH_4NO_3 und KNO_3 in flüssigem Medium ausgesetzt

war die Tendenz in beiden Fällen dieselbe. Je höher die Nitratkonzentration, desto geringer die Anthocyansynthese der Gewebekulturen. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 18 graphisch wiedergegeben.

Daß die Hemmung der Pigmentbildung durch den Stickstoffanteil der Nitrate hervorgerufen wurde und nicht eine Folge der erhöhten Ionenkonzentration war, bewiesen Versuche mit organisch gebundenem Stickstoff, in denen Glutaminsäure die wirksame Substanz war.

Die dem Ammoniumnitrat im Skoog'schen Medium in Bezug auf den Stickstoff äquivalente Menge Glutaminsäure war 600 mg/100 ml Nährlösung. Auch hier wurde wie bei Zugabe von Kalium- und Ammoniumnitrat die Anthocyansynthese bereits nach 24-stündiger Einwirkungsdauer vor der Bestrahlung sehr stark vermindert. Eine totale Hemmung durch 600 mg Glutaminsäure in 100 ml White'schem Medium fand aber erst nach 4-tägiger Behandlung statt. Der zeitliche Verlauf der Hemmwirkung der Glutaminsäure auf die Anthocyansynthese der Gewebekulturen ist in der Tabelle XV angegeben.

(Stickstoffäquivalente). Bestrahlungsdauer 48 Stunden, Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen.
Ordinate: Extinktion/3,14 cm², Abszisse: Konzentrationen mg/100 ml.

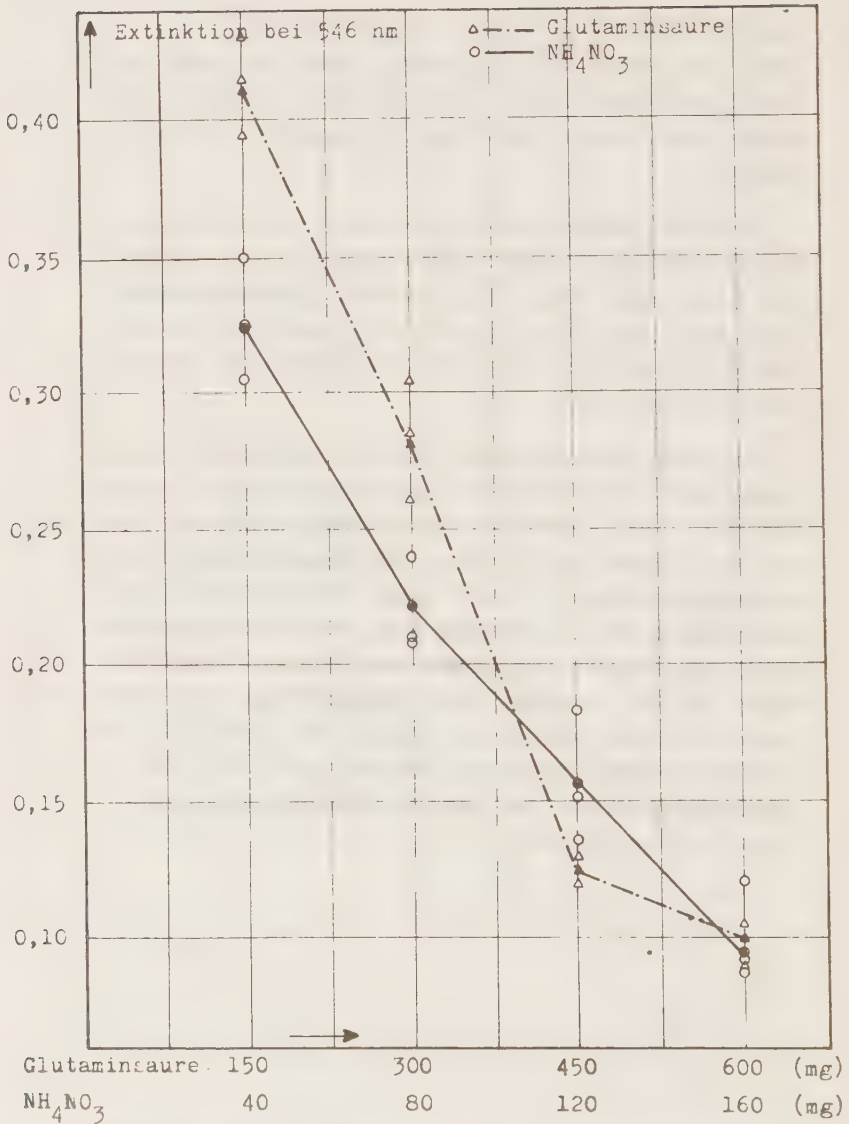


Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Glutaminsäure und Ammoniumnitrat.

Das Gewebe wurde 48 Stunden der Einwirkung verschiedener Konzentrationen NH_4NO_3 und Glutaminsäure (stickstoffäquivalent) in flüssigem Medium ausgesetzt. Die Bestrahlung ($12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$, 28°C) betrug 48 Stunden (Kontrolle ohne

Tabelle XV: Zeitlicher Verlauf der Hemmung der Anthocyansynthese durch Glutaminsäure

Haplopappusgewebe wurde 1 bis 4 Tage in flüssigem Whitemedium mit einem Zusatz von 600 mg Glutaminsäure/100 ml Nährlösung auf einer Schüttelapparatur geschüttelt, abfiltriert, auf glutaminsäurehaltigem Agarboden verstrichen und 48 Stunden im Blaulichtfeld mit $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt. Die Extraktion mit HCl-Propanol erfolgte sofort anschließend an die Bestrahlung (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen HCl-Propanol).-

Einwirkungs- dauer	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
Extinktion	E = 0,270	E = 0,100	E = 0,110	E = 0,060
	E = 0,230	E = 0,105	E = 0,100	E = 0,065
	E = 0,255	E = 0,090	E = 0,115	E = 0,075
Dunkelkontrolle:		Lichtkontrolle (ohne N-Zusatz):		
K = 0,060		K = 0,982		

Die Hemmung der Anthocyansynthese durch Glutaminsäure erwies sich ebenso als konzentrationsabhängig wie diejenige, die durch Nitrat hervorgerufen wurde. In der Abbildung 19 sind die Extinktionswerte angegeben, die durch Zugabe von Glutaminsäure und Ammoniumnitrat in jeweils verschiedenen Konzentrationen bei Bestrahlung mit Blaulicht von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ (48 Stunden) und einer Einwirkungsdauer der Substanzen von 48 Stunden vor der Bestrahlung erzielt worden sind.

N-Zusatz K = 0,945). Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen, Ordinate: Extinktion/ $3,14\text{ cm}^2$, Abszisse: Konzentration (mg/100 ml).

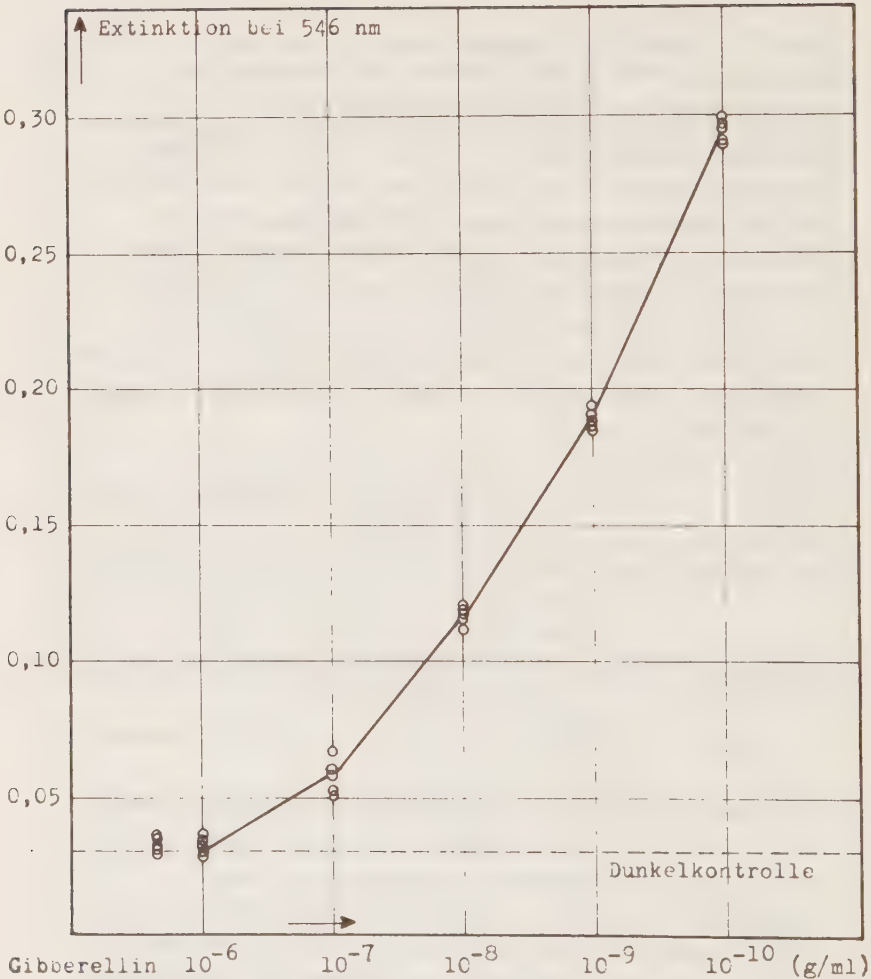


Abbildung 20: Konzentrationsabhängigkeit der Anthocyanhemmung durch GA_3 .

Die Einwirkungs-dauer des Gibberellins betrug 48 Stunden. Die Gibberellinlösungen wurden dem flüssigen Whitemedium in verschiedener Konzentration zugegeben. Während der Einwirkungs-dauer wurden die Kulturen geschüttelt, anschließend abfiltriert und auf gibberellinhaltigem Agarboden in Petrischalen verstrichen und 48 Stunden mit Blaulicht von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt. Es sind die Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen angegeben. Die Ordinate zeigt die Extinktion/ $3,14\text{ cm}^2$,

3. Gibberellinsäure

Während 2,4-D, IES und Kinetin in Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-6} g/ml Nährlösung die Anthocyan synthese in den Gewebekulturen von Haplopappus gracilis nicht beeinflussten, konnte ähnlich wie bei Spirodela (THIMANN und Mitarbeiter 1964) durch geringe Mengen Gibberellinsäure (GA_3) die Pigment synthese je nach Einwirkungsdauer ganz oder zum Teil aufgehoben werden.

Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit wurden die Gibberellinlösungen dem Gewebe in flüssigem Medium steril zugegeben. Die Einwirkungsdauer betrug 48 Stunden. Während dieser Zeit wurden die Kulturen auf einer Schüttelapparatur geschüttelt, anschließend wurden sie abfiltriert und auf festem gibberellinhaltigen Agarboden in Petrischalen verstrichen. Nach 48-stündiger Bestrahlung mit Blaulicht von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C zeigte sich, daß eine Konzentration von 10^{-10} g/ml bereits um mehr als 50 % hemmte und daß 10^{-6} g GA_3 /ml die Anthocyanbildung im Gewebe völlig verhinderte. Dabei blieb das Gewebe hell und ungeschädigt. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse zeigt die Abbildung 20.

Durch längere Bestrahlungsdauer konnte die Hemmung der Anthocyan synthese durch 10^{-6} g Gibberellin/ml Nährlösung teilweise wieder aufgehoben werden. Gewebe, das bei einer 48-stündigen Lichtperiode völlig ungefärbt blieb, bildete während fortdauernder Lichtgabe Anthocyan. Nach einer Einwirkungsdauer von 10 Tagen vor der Bestrahlung (10^{-6} g/ml) war die Pigment-

die Abszisse die Konzentration der Gibberellinsäure in g/ml Nährlösung.

synthese jedoch so stark gehemmt, daß auch nach einer 10-tägigen Bestrahlung kein Anthocyan mehr auftrat. Im Antagonismus zwischen Licht- und Gibberellinwirkung überwog bei kurzer Einwirkungszeit das Licht, bei längerer die Gibberellinsäure (siehe Tabelle XVI).

Tabelle XVI: Antagonismus zwischen Lichtförderung und Gibberellinhemmung der Anthocyansynthese in Gewebekulturen

Haplopappusgewebe wurde 2 bis 10 Tage in GA_3 -haltigem, flüssigem Whitemedium geschüttelt (10^{-6} g/ml). Nach 2 bzw. 10 Tagen wurde es abfiltriert, auf Agarboden verstrichen und 2 bis 10 Tage lang im Blaulichtfeld bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ und 28°C bestrahlt. Die Extraktion der Proben erfolgte sofort anschließend an die Bestrahlung. Wegen der geringen Anthocyanausbeute wurden immer zwei Proben zusammen extrahiert und gemessen (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen HCl-Propanol).-

Einwirkungs- dauer 48 Stunden			
Bestrahlungs- dauer	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
	E = 0,075	E = 0,110	E = 0,136
	E = 0,070	E = 0,100	E = 0,125
	E = 0,073	E = 0,097	E = 0,118
	E = 0,080	E = 0,105	E = 0,200
	E = 0,070	E = 0,100	E = 0,205
Dunkelkontr.	K = 0,075	K = 0,070	K = 0,073
=====			
Einwirkungs- dauer 240 Stunden			
Bestrahlungs- dauer	120 Stunden	240 Stunden	
	E = 0,075	E = 0,080	
	E = 0,096	E = 0,078	
	E = 0,092	E = 0,077	
Dunkelkontr.	K = 0,080	K = 0,089	

Wurde die Gibberellinsäure dem Gewebe in flüssigem Medium zugegeben, so führte bereits eine 24-stündige Einwirkungszeit zu einer vollständigen Hemmung der Synthese bei Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität und einer Lichtperiode von 48 Stunden. Die Hemmwirkung blieb noch 48 Stunden erhalten, nachdem das Gewebe mehrfach gespült und wieder auf normales Whitesches Medium ohne Gibberellin gesetzt worden war. Danach gewann es die Synthesefähigkeit wieder zurück, wie die Tabelle XVII deutlich macht.

Tabelle XVII: Zeitlicher Verlauf der Hemmung durch GA₃

Haplopusgewebe wurde in flüssiges Whitemedium mit einem Zusatz von 10^{-6} g/ml Gibberellinsäure gebracht. I. Das Gewebe wurde nach 24 Stunden abfiltriert und auf gibberellinhaltigem Agarboden verstrichen und 48 Stunden bei $12\ 750\ \text{erg/cm}^2\ \text{sec}$ bestrahlt. II. Das Gewebe wurde 3 Tage im GA₃-haltigen Medium belassen, gespült (aqua dest.) und auf normalem Whitemedium verstrichen. Nach 1, 2 und 3 Tagen wurden Proben entnommen und ebenfalls 48 Stunden bestrahlt, die Extraktion erfolgte in jedem Fall sofort anschließend an die Bestrahlung (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen HCl-Propanol).

I. 24 h Gibb. II. 3 Tage Gibberellinbehandlung
(48h Bestr.) 1) 24h Entzug 2) 48h Entzug 3) 72h Entz.
(48h Bestr.) (48h Bestr.) (48h Bestr.)

E = 0,055			
E = 0,055	E = 0,048	E = 0,048	E = 0,085
E = 0,048	E = 0,030	E = 0,035	E = 0,098
E = 0,052	E = 0,039	E = 0,030	E = 0,079
E = 0,040	E = 0,045	E = 0,028	E = 0,089
Dunkelkontrolle:			
K = 0,050	K = 0,052	K = 0,037	K = 0,035

Die Frage, in welcher Phase der Pigmentbildung die Gibberellinsäure eingriff, war nicht eindeutig zu beantworten. Sicher ist, daß die Anthocyan synthese in ihrer Dunkelphase gehemmt wurde, wenn die Lichtreaktion vorher im gibberellinfreien Medium ablaufen konnte. Das Gibberellin drang sehr schnell in die Zellen ein und verlor nur langsam wieder an Wirksamkeit (siehe Tabelle XVII). Wurde es in der Lichtphase zugegeben, so konnte es für die Dunkelphase nur aus dem Medium, nicht aber aus den Zellen wieder entfernt werden. Auch Versuche mit einem Fluorenolderivat (9-Hydroxyfluorencarbonsäure-(9)) führten hier zu keinem Ergebnis, da das Antigibberellin die Hemmung nur zum Teil aufzuheben vermochte. Die Hemmung der Anthocyan synthese in der Dunkelphase der Reaktion ist in der Tabelle XVIII ausgeführt.

Tabelle XVIII: Zeitpunkt der Hemmung durch Gibberellin: Dunkelphase

Haplopappusgewebe wurde zunächst auf normalem Whiteschem Medium in Petrischalen im Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt und anschließend für die Dunkelbehandlung in flüssiges Medium gebracht: I. Ein Teil des Gewebes kam in Whitemedium ohne Zusatz, II. ein zweiter in gibberellinhaltiges Medium (10^{-6} g/ml). Nach 24-stündiger Dunkelbehandlung auf der Schüttelapparatur wurde das Gewebe abfiltriert und extrahiert. Die Extinktion wurde wegen der geringen Anthocyanausbeute jeweils für 2 Proben bestimmt. (10 ml, 5 cm Küvetten, gegen HCl-Propanol).-

I. 24 Stunden Bestrahl. +24 " Dunkel (White)	II. 24 Stunden Bestrahlung +24 " Dunkel (White + GA_3)
---	---

E = 0,350	E = 0,090
E = 0,300	E = 0,095
E = 0,372	E = 0,085
E = 0,400	E = 0,080
E = 0,426	E = 0,085
E = 0,400	E = 0,090
Dunkelkontrolle:	
K = 0,090	K = 0,080
K = 0,085	K = 0,075

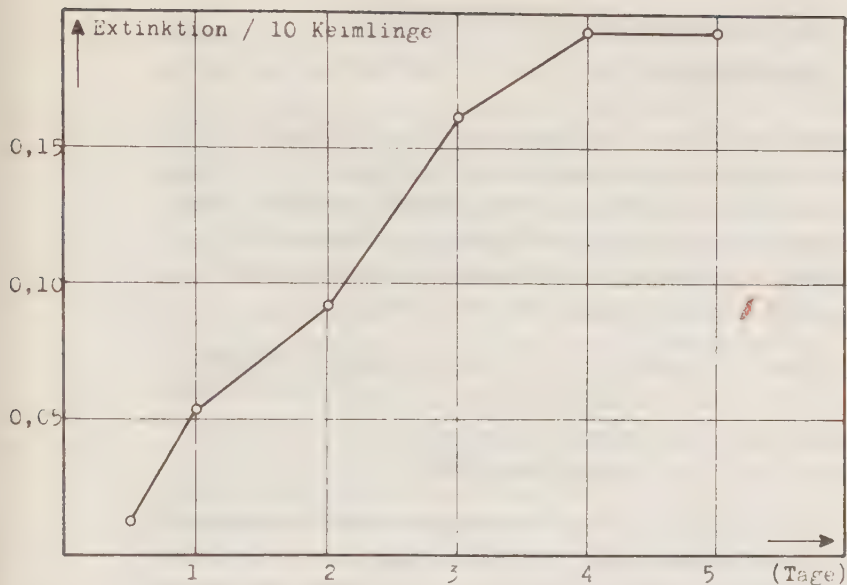


Abbildung 21: Abhängigkeit der Anthocyansynthese von der Dauer der Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität. Keimlinge von *Haplopappus* (etioliert, 10 Tage alt) wurden 12 Stunden bis 5 Tage mit Blaulicht von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bestrahlt. Es sind die Mittelwerte aus drei Versuchen angegeben, Ordinate: Extinktion, Abszisse: Dauer (Tage).

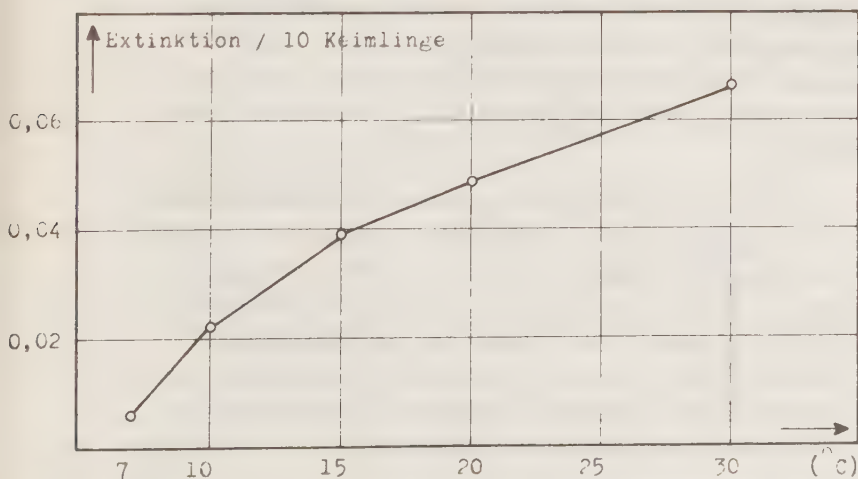


Abbildung 22: Abhängigkeit der Anthocyansynthese von der Temperatur der Bestrahlung. Die Keimlinge wurden 24 Stunden bei verschiedenen Temperaturen im Blaulicht von $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bestrahlt. Die Kurve ergibt sich aus den Mittelwerten von je drei Versuchen, Ordinate: Extinktion/10 Keiml.. Abszisse: Temperatur.

b) Keimlinge von Haplopappus gracilis

I. Außenfaktoren

Wurden etioliierte Keimlinge von Haplopappus gracilis mit Blaulicht hoher Intensität bestrahlt ($12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$), so führte diese Behandlung bei einer Versuchstemperatur von 28°C nach 24 Stunden zur Bildung von Anthocyan. Rotlicht blieb auch nach längerer Bestrahlungsdauer unwirksam.

Diese Photoreaktion war außerordentlich energiebedürftig. Bei Intensitäten von weniger als $10\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ kam es auch nach mehrtägiger Versuchsdauer nicht zur Anthocyansynthese.

Das Pigment trat unter obengenannten Bedingungen mit einer Verzögerung von 20 Stunden auf. Die Anthocyanmenge im Gewebe stieg mit der Bestrahlungsdauer an, bis nach etwa 5 Tagen ein Sättigungswert erreicht war. Im Gegensatz zum Gewebe bildeten die Keimlinge im Dunkeln anschließend an die Lichtperiode nur sehr wenig Pigment nach. Daher wurde in den folgenden Versuchen auf eine Dunkelbehandlung anschließend an die Bestrahlung verzichtet. Die Abhängigkeit der Anthocyansynthese von der Dauer der Bestrahlung ist in der Abbildung 21 graphisch dargestellt.

Die Temperatur während der Bestrahlung beeinflusste die Pigmentsynthese im Keimling ebenso wie in den Gewebekulturen. Temperaturen unter 10°C hemmten die Reaktion vollkommen. Zwischen 10 und 30°C stieg die Anthocyansynthese etwa linear an. Am günstigsten waren auch hier wie beim Gewebe 28°C , da höhere Temperatur die Keimlinge bei längerer Bestrahlungsdauer schädigten (siehe Abbildung 22).

Wurden die Pflänzchen auf einem Medium angezogen, das außer Whitesalzen nur Agar und organische Zusätze enthielt, dann ging die Synthesefähigkeit nach etwa 10 Tagen verloren. Befand sich im Nährboden außer den obengenannten Substanzen Saccharose, so konnten die auf diesem Medium gekeimten Pflanzen auch nach 4-wöchiger Dunkelbehandlung noch Anthocyan bilden. Dabei zeigte sich, daß auch Epikotyl und Primärblätter bei Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität in der Lage sind, Anthocyan zu synthetisieren (siehe Tabelle XIX).

Tabelle XIX: Alter der Keimlinge			
Keimlinge von Haplopappus, die auf (I) Whitemedium mit 2 % Saccharose, (II) ohne Zucker angezogen worden waren, wurden im Alter von 3, 10 und 28 Tagen 48 Stunden bei 12 750 erg/cm ² sec bestrahlt (28°C). Eine Probe bestand aus jeweils 10 Keimlingen, die in 10 ml HCl-Propanol extrahiert wurden.			
Keimlinge auf White mit 2% Saccharose	3 Tage	Alter 10 Tage	28 Tage
	E = 0,070	E = 0,089	E = 0,090
	E = 0,065	E = 0,090	E = 0,095
	E = 0,068	E = 0,075	E = 0,089
=====			
Keimlinge auf White ohne Saccharose	E = 0,058	E = 0,005	
	E = 0,063	E = 0,003	
	E = 0,045	E = 0,003	
Dunkelkontrollen:	K = 0,003	K = 0,0021	K = 0,004

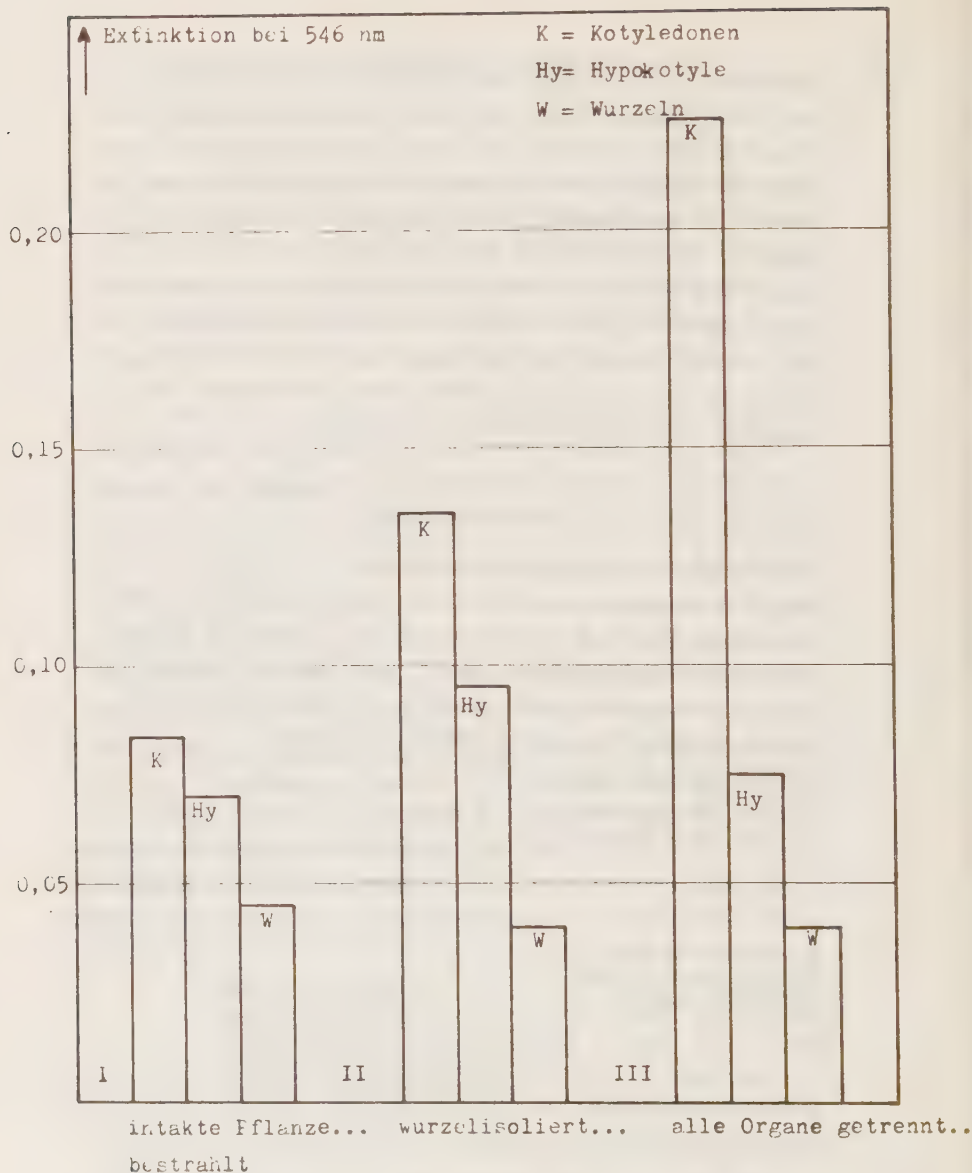


Abbildung 23: Förderung der Anthocyansynthese im isolierten Kotyledo.

Die Keimlinge bzw. Organe wurden 5 Tage mit Blaulicht der Intensität $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt und anschließend zu je 10 in 10 ml HCl-Prop. extrahiert. I. Bestrahlung der inaktiven Pflanze, Extraktion der Organe getrennt, II. Nur die Wurzel wurde isoliert bestrahlt, alle Organe getrennt extrahiert,

II. Anthocyanbildung in den einzelnen Organen

Der Farbstoff war in allen Organen des Keimlings zu finden, in Kotyledonen, Hypokotyl und in der Wurzel. Mikroskopische Untersuchungen ergaben, daß er jeweils in verschiedenen Geweben auftrat. Die Abbildungen 26 bis 28 sind Photographien von Querschnitten durch bestrahlte Keimlinge (500-fache Vergrößerung) und geben die Orte der Anthocyanbildung in den Organen an.

Die Kotyledonen enthielten hauptsächlich auf der Blattunterseite Anthocyan. Es zeigte sich, daß nur die chlorophyllfreien Zellen der Epidermis rot gefärbt waren. Im Hypokotyl befanden sich außer in der Epidermis auch in der Superepidermis anthocyanhaltige Zellen. Im Gegensatz dazu blieben die äußersten Schichten der Wurzel stets pigmentfrei. Hier war das Anthocyan in den inneren Rindenschichten lokalisiert, und zwar auch auf der unbestrahlten Seite.

Wurden die einzelnen Organe des Haplopappuskeimlings getrennt voneinander bestrahlt, so zeigte sich, daß jedes für sich allein zur Pigmentsynthese fähig war. Wurzel, Hypokotyl und Kotyledonen waren demnach in der Lage, unabhängig voneinander alle Vorgänge, die zur Anthocyansynthese führen, selbst zu vollziehen (siehe Abbildung 23).

III. die Organe wurden vor der Bestrahlung isoliert und getrennt behandelt. Es sind die Mittelwerte aus je drei Versuchen angegeben. Die Ordinate gibt die Extinktion/10 Organe an, die Abszisse ist ohne Dimension.

Der Unterschied zwischen den Meßreihen I und III für die Kotyledonen ist mit $P < 0,0005$ gesichert.-

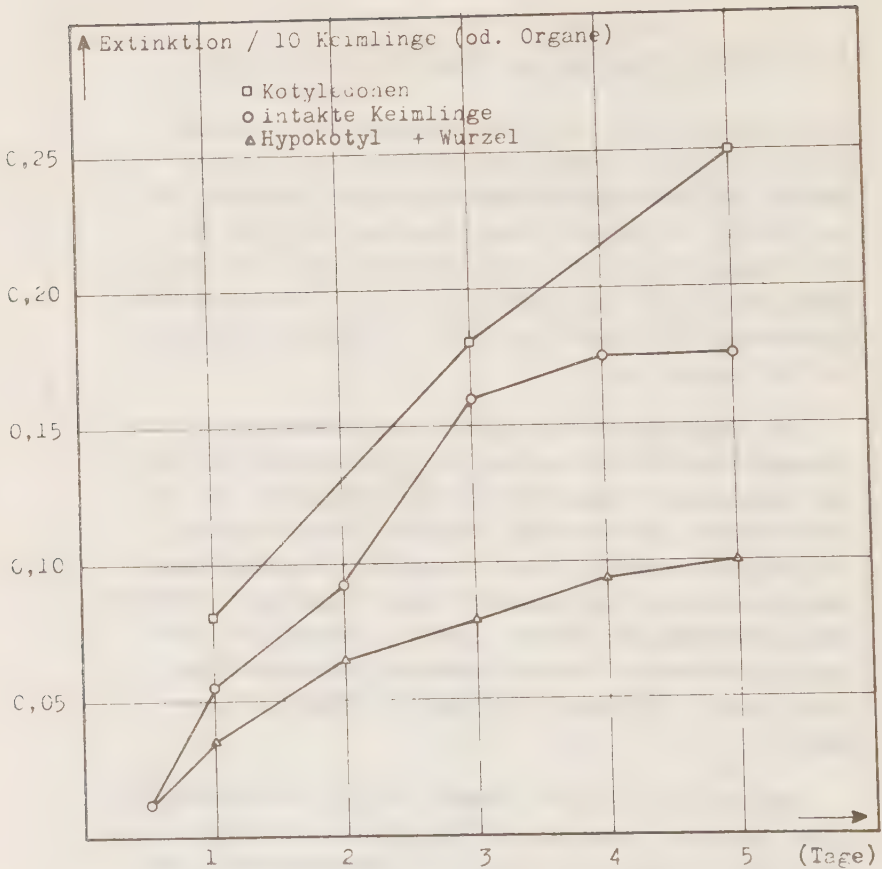


Abbildung 24: Fortdauer der Anthocyansynthese der isolierten Organe von *Haplopappus gracilis* mit der Dauer der Bestrahlung.

Kotyledonen, intakte Keimlinge und Hypokotyl und Wurzel wurden 12 Stunden bis 5 Tage einer Bestrahlung mit Blaulicht der Intensität $12\,750 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ bei 28°C ausgesetzt und anschließend zu jeweils 10 Stück in 10 ml HCl-Prop. extrahiert. Die Kurven entstanden aus den Mittelwerten von jeweils drei Versuchen. Die Ordinate gibt die Extinktion/10 Keimlinge bzw. 10 Organe, und die Abszisse die Dauer der Bestrahlung in Tagen an.

III. Verwundungseffekt

Bei der getrennten Bestrahlung der Organe des Haplopappuskeimlings ergab sich, daß Hypokotyl und Wurzel nach der Isolierung etwa ebensoviel Anthocyan bildeten wie an der intakten Pflanze. Die Abtrennung hatte keinen Einfluß auf die Pigmentsynthese dieser beiden Organe (siehe Abbildung 23).

In den Kotyledonen rief die Isolierung dagegen eine erhebliche Steigerung der Anthocyansynthese hervor. Wurde nur die Wurzel abgetrennt, so führte auch diese Verwundung des Keimlings zu einer Syntheseförderung in den Kotyledonen. Die Steigerung des Anthocyangehaltes der Keimblätter nach Verwundung oder Abtrennung ist in der Abbildung 24 graphisch dargestellt. Die Isolierung der Organe brachte niemals eine Pigmentsynthese im Dunkeln mit sich.

Wie im intakten Keimling, so stieg auch in den abgetrennten Organen die Anthocyanmenge mit der Dauer der Bestrahlung an. Die isolierten Kotyledonen produzierten mehr Anthocyan unter gleichen Bedingungen als die intakte Pflanze. Dieser Anstieg der Pigmentmenge mit der Bestrahlungsdauer in Hypokotyl und Wurzel deutet darauf hin, daß auch in diesen Organen Vorstufen gebildet werden konnten oder daß sie in gebundener Form bereits vorlagen (siehe Abbildung 24).

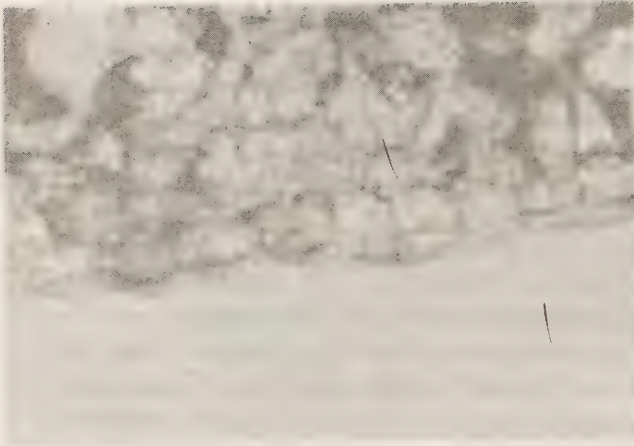


Abbildung 25

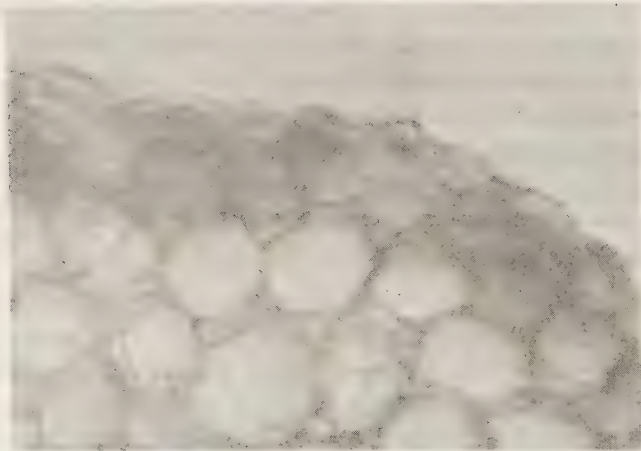


Abbildung 26

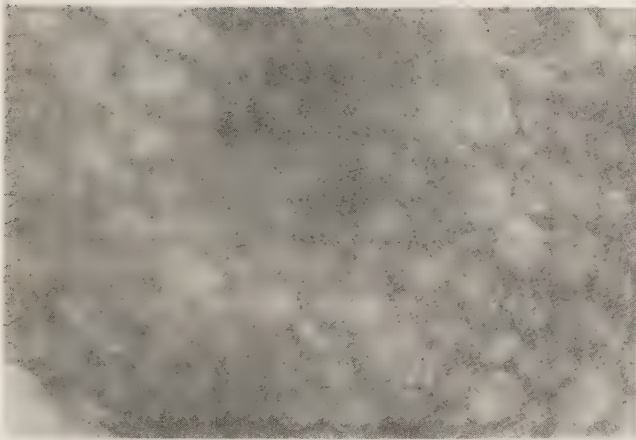


Abbildung 27

Mikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch die Organe eines Keimlings von *Haplopappus gracilis*, der zuvor 24 Stunden mit Blaulicht der Intensität $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C bestrahlt worden ist.

Abbildung 25: Querschnitt durch ein Keimblatt; der Ausschnitt zeigt anthocyanhaltige Epidermiszellen auf der Blattunterseite.

Abbildung 26: Querschnitt durch das Hypokotyl; es wird deutlich, daß in diesem Organ außer in der Epidermis auch in subepidermalen Schichten Anthocyan enthalten ist.

Abbildung 27: Querschnitt durch die Wurzel; hier liegen die anthocyanhaltigen Zellen in den inneren Rindenschichten des Organs.

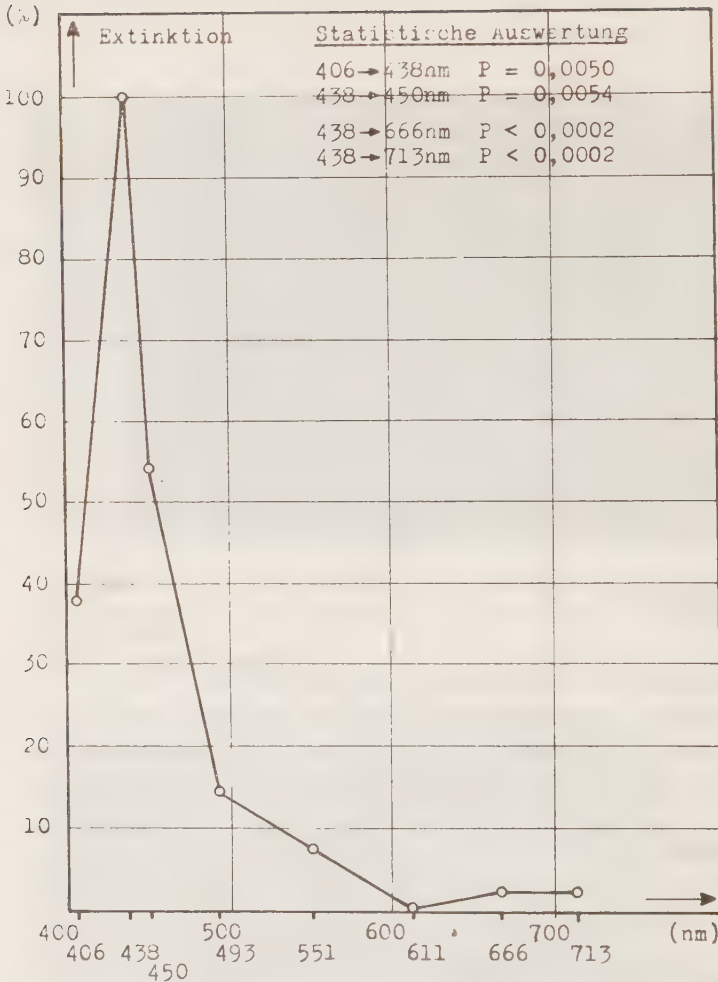


Abbildung 28: Wirkungsspektrum der Anthocyan synthese der Gewebekulturen von *Haplopappus* für den sichtbaren Bereich des Spektrums.

Das Gewebe wurde durch 2, 3 und 4-tägige Bestrahlung mit monochromatischem Licht zur Anthocyanbildung im Blaubereich induziert. Das graphische Bild des Wirkungsspektrums entstand durch Umrechnung der Extinktionswerte auf prozentuale Aktivität bezogen auf das Maximum bei 438 nm. Es sind die Mittelwerte von vier Versuchen angegeben worden. Die Ordinate zeigt die Extinktion $E\%$ bezogen auf das Maximum bei 438 nm, die Abszisse die Wellenlänge λ in nm.

c) Spektrale Abhängigkeit der lichtinduzierten Anthocyansynthese in Keimlingen und Gewebekulturen von Haplopappus

I. Wirkungsspektrum

Bei der Untersuchung der für die Anthocyansynthese wirksamen Spektralbereiche wurden die in den vorangegangenen Versuchen ermittelten optimalen Bedingungen für die Pigmentbildung verwendet.

Die Grenze der Emission war durch die Art der Spektralanlage mit $1\,362 \times 10^{12}$ und mit Hilfe von Hohlspiegeln unter Verlust der Homogenität des Lichtfeldes mit $2\,270 \times 10^{12}$ Quanten/cm² gegeben. Im Ultraviolettbereich konnte das Wirkungsspektrum mit Hilfe einer Xenon-Hochdrucklampe bei $1\,134 \times 10^{13}$ Qu/cm² sec bestimmt werden (siehe Seite 20).

Bestrahlt wurde immer bei einer Raumtemperatur von 28°C, und auch während der anschließenden Dunkelbehandlungen ist die Temperatur immer auf diesem Stand gehalten worden.

1. Gewebekulturen

Das unter obengenannten Bedingungen und monochromatischer Bestrahlung ermittelte Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese der Gewebekulturen von Haplopappus gracilis war zweigipflig. Es zeigte ein scharfes Maximum um 438 nm. Zum Langwelligen hin, wie zum kurzwelligen Blau sank die Aktivität stark ab (siehe Abbildung 28).

Die Grenze der Wirksamkeit, die durch Bestrahlung mit $1\,565 \times 10^{12}$ Quanten/cm² sec ermittelt werden konnte, lag im sichtbaren Bereich zwischen 474 und 498 nm. Rotlicht war für die Anthocyansynthese unwirksam (siehe Tabelle XX).

Tabelle XX: Grenze der Aktivität im langwelligen Bereich		
Das Gewebe wurde 8 Stunden im Blaulichtfeld bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ und anschließend in der Spektralanlage bei verschiedenen Wellenlängen mit $1\,565 \times 10^{12}\text{ Quanten/cm}^2\text{ sec}$ bestrahlt. An die Lichtperiode schloß sich eine 24-stündige Dunkelbehandlung an. Die Versuchstemperatur betrug 28°C . Gemessen wurde in 5 cm Küvetten nach Verdünnung der Extrakte auf 10 ml gegen die Kontrolle (= Präinduktionskontrolle).		
Filter	Extinktion	Extinktion
474 nm	E = 0,056	E = 0,077
498 nm	E = 0,007	E = 0,003
520 nm	E = 0,024	E = 0,000
551 nm	E = 0,013	E = 0,000
Präinduktionskontrolle (gegen HCl-Prop.)	K = 0,058	K = 0,080

Das Wirkungsspektrum für den sichtbaren Bereich wurde durch mehrtägige Bestrahlung (2 bis 4 Tage) mit monochromatischem Licht gewonnen. Die Synthese konnte jedoch durch vorhergehende Präinduktion, das heißt durch 8-stündige Bestrahlung im Blaulichtfeld mit $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$, erheblich gesteigert werden. Danach kam es nur bei den wirksamen Wellenlängen zu einer Induktion und damit zur Bildung des Pigments.

Die Tabelle XXI gibt die Werte an, die bei diesen Versuchen erzielt worden sind. Sie zeigt gleichzeitig, daß das Maximum prägnanter und damit der Verlauf des Wirkungsspektrums steiler wurde, wenn

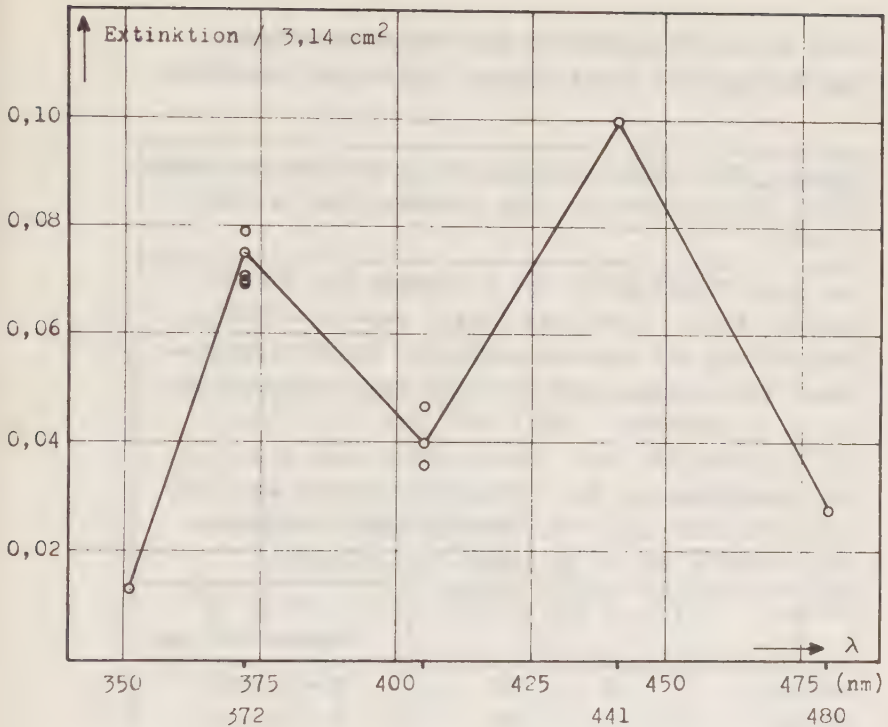


Abbildung 29: Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese von Gewebekulturen im kurzwelligen Spektralbereich mit Maxima bei 372 und 441 nm.

Gewebekulturen von Haplopappus wurden mit monochromatischem Licht der gleichen Quantenstromdichte bei verschiedenen Wellenlängen bestrahlt. Für den Bereich des kurzwelligen Blaulichts waren nur die verwendeten Filter im Handel erhältlich (Schott und Genossen). Die Lichtperiode betrug 24 Stunden, die anschließende Dunkelperiode ebenfalls 24 Stunden. Das Licht wurde in einer Intensität von $1\,134 \times 10^{13}$ Quanten/cm² sec (entsprechend 50 000 erg/cm² sec bezogen auf 450 nm) gegeben. Das Wirkungsspektrum ergab sich aus den Mittelwerten von 3 bis 5 Versuchen. Die Ordinate gibt die Extinktion der Proben als Extinktion/3,14 cm², die Abszisse die Wellenlänge λ in nm an.

sich an die Präinduktion eine monochromatische Bestrahlung mit Licht höherer Intensität anschloß.

Tabelle XXI: Anthocyansynthese im monochromatischen Licht anschließend an eine Präinduktion im Blaulicht

Auf eine Präinduktion von 8 Stunden bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ im Blaulicht folgte eine 24-stündige Bestrahlung mit monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen und gleicher Quantenstromdichte. I. Intensität $1\,362 \times 10^{12}$ und II. $1\,134 \times 10^{12}$ Quanten/cm² sec. Daran schloß sich eine Dunkelbehandlung an. Die Versuchstemperatur war 28°C. Gemessen wurde in 5 cm Küvetten nach Verdünnung der Extrakte auf 10 ml gegen die Kontrolle.

Filter	I. $1\,362 \times 10^{12}$	II. $1\,134 \times 10^{12}$ Quanten/cm ² sec
406 nm	E = 0,100	E = 0,108
438 nm	E = 0,385	E = 0,206
450 nm	E = 0,180	E = 0,129
493 nm	E = 0,044	E = 0,006
551 nm	E = 0,026	E = 0,011
611 nm	E = 0,000	E = 0,021
666 nm	E = 0,028	E = 0,000
713 nm	E = 0,000	E = 0,000
<u>Präindukt.-</u> <u>kontrolle:</u> (gegen HCl- Propanol)	K = 0,098 K = 0,062	K = 0,066 K = 0,060

Der zweite Gipfel des Wirkungsspektrums der Anthocyansynthese von Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* lag im langwelligen UV-Bereich bei 372 nm. Bei 350 nm fand keine Pigmentbildung mehr statt und gegen 400 nm sank die Aktivität auf ein Minimum ab (siehe Abbildung 29).

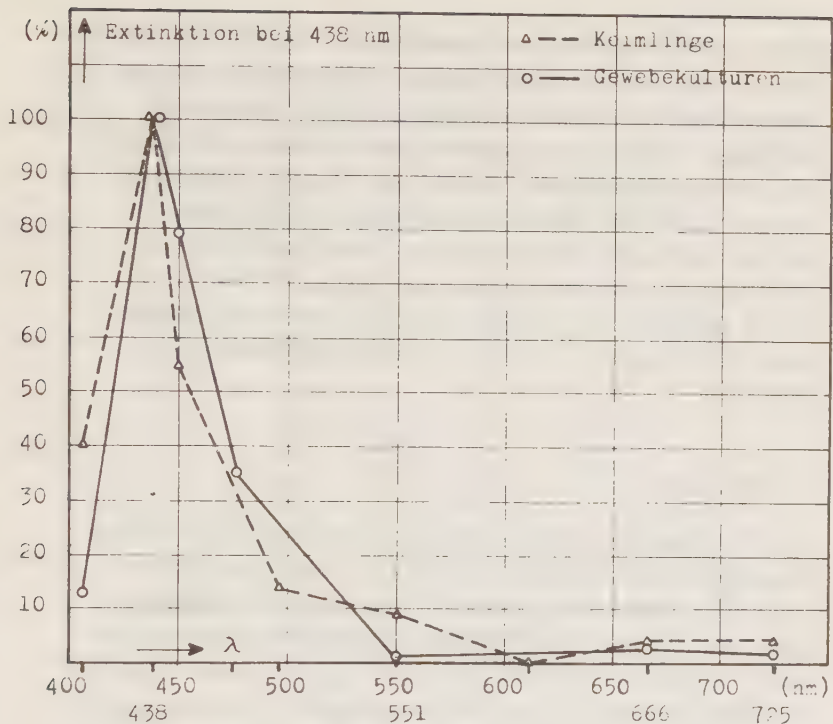


Abbildung 30: Vergleich der Wirkungsspektren der Anthocyan-synthese der Keimlinge und Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* für den sichtbaren Bereich des Spektrums.

Die Keimlinge wurden 5 Tage lang mit quantengleichem, monochromatischem Licht der Intensität $2\,724 \times 10^{12}$ Quanten/cm² sec bei 28°C bestrahlt. Für die Darstellung des Wirkungsspektrums sind Werte aus drei Versuchen verwendet worden. Angegeben ist die prozentuale Aktivität bezogen auf das Maximum bei 438 nm. (Gewebekulturen siehe Abbildung 29). Die Ordinate zeigt die Extinktion E% bezogen auf das Maximum bei 438 nm, die Abszisse die Wellenlänge λ in nm.

Unter obengenannten Bedingungen trat das Anthocyan bei 372 nm wie in allen bisher beobachteten Fällen anschließend an eine 24-stündige Lichtbehandlung im Dunkeln auf. Durch höhere Intensitäten und längere Bestrahlungsdauer wurde das Gewebe geschädigt. Das galt nur für den kurzwelligen Spektralbereich mit Wellenlängen unter 400 nm. Blau- und Rotlicht vertrugen die Kulturen auch bei Intensitäten um $90\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$. Rotlicht blieb auch bei dieser hohen Lichtenergie für die Anthocyansynthese unwirksam.

2. Keimlinge

Das Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese für Keimlinge von Haplopappus war dem der Gewebekulturen sehr ähnlich. Auch dieses Objekt zeigte Pigmentbildung bei 372 nm (24-stündige Bestrahlung mit 372 nm bei $1\,134 \times 10^{13}\text{ Qu/cm}^2\text{ sec}$, $E = 0,025$, $E = 0,032$, Dunkelkontrolle: $K = 0,003$ für jeweils 10 Keimlinge; Bestrahlung mit 397 nm: $E = 0,015$, $E = 0,010$, $K = 0,004$). Im sichtbaren Bereich lag das Maximum der Aktivität bei 438 nm. Der Gipfel war nicht ganz so steil wie der des Aktionsspektrums der Gewebekulturen. Aber auch hier nahm die Wirksamkeit des Lichtes nach beiden Seiten gleichermaßen ab. Die Abbildung 30 gibt die graphische Darstellung beider Wirkungsspektren in der prozentualen Aktivität bezogen auf die Maxima bei 438 nm.

Die Grenze der Aktivität lag zwischen 474 und 551 nm. Bei 406 zeigte sich noch geringfügige Anthocyanbildung. Rotlicht war auch bei höherer Strahlungsintensität für die Anthocyansynthese unwirksam.

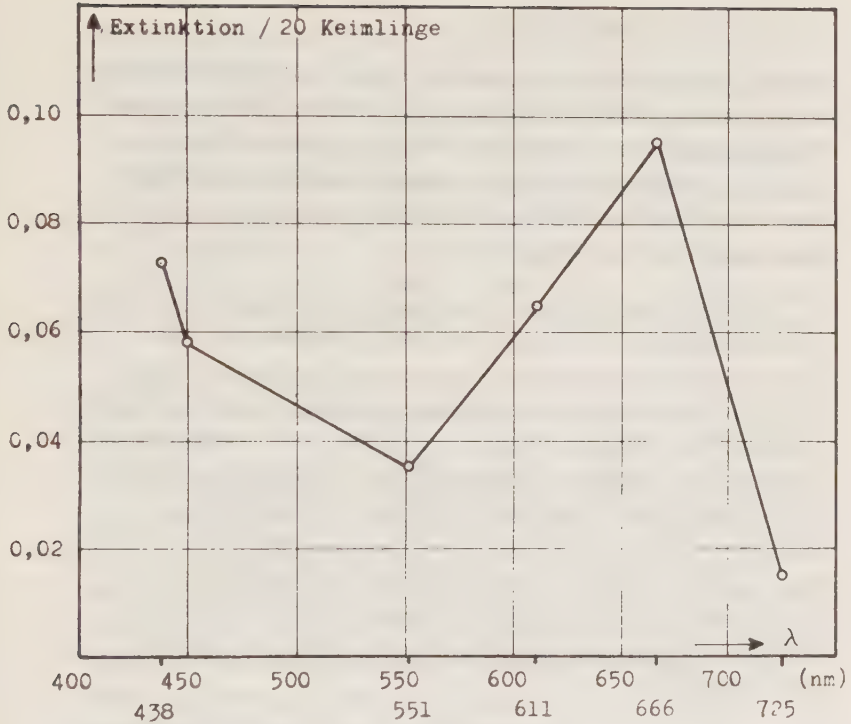


Abbildung 31: Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese isolierter Kotyledonen von *Haplopappus gracilis*.

Die Kotyledonen von 10 Tage alten Keimlingen wurde zu je 20 in einer Petrischale 5 Tage lang mit quantengleichem, monochromatischem Licht bestrahlt. Die Intensität betrug $2\,724 \times 10^{12}$ Quanten/cm² sec, die Temperatur während des Versuches 28°C. Das Wirkungsspektrum ist das Ergebnis der Mittelwerte aus 5 Versuchen. Die Ordinate gibt die Extinktion/20 Keimblätter, die Abszisse die Wellenlänge λ in nm an.

3. Isolierte Kotyledonen

Neben diesem Wirkungsspektrum für die intakte Pflanze muß noch ein zweites genannt werden, das nur in Erscheinung trat, wenn die Pflanze verletzt war. Auch isolierte Kotyledonen reagierten bei monochromatischer Bestrahlung auf andere Wellenlängen als der unverletzte Keimling.

Die Untersuchung der spektralen Abhängigkeit der Pigmentbildung im isolierten Kotyledo ergab, daß der gesamte Bereich des sichtbaren Spektrums wirksam war. Durch die Verwundung erlangten die Kotyledonen die Fähigkeit auch im Grün- und Rotlicht Anthocyan zu synthetisieren. Das Wirkungsspektrum der durch Verwundung veränderten lichtabhängigen Anthocyansynthese in den Kotyledonen hatte ein Maximum im Blaubereich, ein weiteres im Rotbereich des sichtbaren Lichtes. Der Grünanteil hatte auf die Pigmentbildung nur einen geringen Einfluß (siehe Abbildung 31).

Die Verwundung allein verursachte keine Anthocyan-synthese. Die Dunkelkontrollen blieben stets ungefärbt. Lichtenergie war also auch für diesen Biosyntheseweg erforderlich.

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, daß isolierte Kotyledonen im Gegensatz zu intakten Keimlingen im Rotlicht Anthocyan bilden konnten. Im Folgenden wird deutlich, daß die Verletzung der Pflanze diese Veränderung hervorgerufen hat und daß die Abtrennung der Kotyledonen nur eine Art der Verletzung darstellt.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Anthocyansynthese der Keimblätter durch Abtrennen der Wurzel gefördert werden konnte. So kann die Isolierung der Kotyledonen als Verletzung des Keimlings durch Abschneiden von Wurzel und Hypokotyl angesehen werden. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, daß bei Abtrennung nur eines Kotyledons der am verletzten Keimling verbleibende ebenfalls in der Lage war im Rotlicht Anthocyan zu bilden (siehe Tabelle XXII).

Tabelle XXII: Anthocyansynthese des verletzten Keimlings

Die Kotyledonen von 10 Tage alten Keimlingen (etioliert) wurden (I) zur Hälfte isoliert. Ein Keimblatt (II) verblieb an der Pflanze. Die Keimblätter von je 20 Pflanzen (20 x 1 isoliertes Keimblatt, 20 x verletzte Pflanze mit einem Keimblatt) wurden 5 Tage lang in monochromatischem Licht der gleichen Quantenstromdichte $2\,724 \times 10^{12} \text{ Qu/cm}^2 \text{ sec}$ bestrahlt und anschließend in 10 ml extrahiert.

<u>Filter</u>	I. Extinktion von 20 isolierten Kotyledonen	II. Extinktion von 20 am Keiml. ver- bliebenen Kotyl.
438 nm	E = 0,072	E = 0,095
450 nm	E = 0,058	E = 0,090
551 nm	E = 0,035	E = 0,055
611 nm	E = 0,065	E = 0,070
666 nm	E = 0,095	E = 0,120
725 nm	E = 0,015	E = 0,020
Dunkelkontr.:	K = 0,005	K = 0,003

Während Hypokotyl und Wurzel im Rotlicht völlig ungefärbt blieben, fand in isolierten Kotyledonen sowohl Chlorophyll- als auch Anthocyansynthese statt. Die Bildung der beiden Farbstoffe konnte leicht

voneinander getrennt beobachtet werden. Hierzu wurden die Keimlinge zunächst unverletzt zwei Tage im Rotlicht gehalten. Während dieser Behandlung trat ausschließlich Chlorophyll in den Kotyledonen auf. Anschließend erfolgte Isolierung der Keimblätter und fortdauernde Rotlichtbestrahlung der isolierten Organe. Erst jetzt setzte die Anthocyansynthese ein. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Anthocyanbildung in den abgetrennten Kotyledonen nicht mit der Chlorophyllsynthese gekoppelt war (siehe Tabelle XXIII).

Tabelle XXIII: Reaktion chlorophyllhaltiger Kotyledonen

Keimblätter von Haplopappus wurden 2 Tage mit Rotlicht (666 nm) der Intensität $2\,724\text{ Quanten/cm}^2\text{ sec}$ bestrahlt. Von einem Teil wurden die Kotyledonen abgetrennt (II) und 5 Tage unter denselben Bedingungen weiterbehandelt. Ein weiterer Teil (I) blieb intakt und wurde ebenfalls 5 Tage weiterbestrahlt. Parallel dazu erfolgte die Isolierung von Kotyledonen etiolierter ungefärbter Keimlinge (III) und eine 5-tägige Rotbestrahlung dieser Organe. 10 Keimlinge bzw. 20 Kotyledonen, extrahiert in 10 ml HCl-Propanol ergeben in 5 cm Küvetten gemessen einen Extinktionswert.

I.intakte Keimlinge	II.chlorophyllhaltige Kotyled.	III.pigmentfreie Kotyledonen
E = 0,003	E = 0,095	E = 0,090
E = 0,004	E = 0,100	E = 0,092
E = 0,003	E = 0,080	E = 0,098
Dunkelkontr.:		
K = 0,003	K = 0,001	K = 0,001

Wurden die Kotyledonen auf ein Medium (White) gebracht, das den Photosynthesehemmstoff DCMU (10^{-4}g/ml) enthielt, so bildeten sie bei Bestrahlung mit Rotlicht

kein Anthocyan. Durch die Hemmung der Photosynthese konnte gleichzeitig die Biosynthese des Anthocyans in diesem Wellenlängenbereich verhindert werden. Im Blaulicht lief die Pigmentbildung in den isolierten Kotyledonen, wie auch in den intakten Keimlingen trotz des DCMU-Gehaltes des Mediums ungehindert ab (siehe Tabelle XXIV).

Tabelle XXIV: Hemmung der Rotlichtinduktion durch DCMU		
Isolierte Kotyledonen und unverletzte Keimlinge wurden auf ein Medium gebracht, das 10^{-4} g/ml DCMU enthielt (Whitemedium). Die Kotyledonen wurden 5 Tage lang im monochromatischen Rot- und Blaulicht (666 nm, 438 nm) bei 28°C bestrahlt. Die intakten Keimlinge blieben ebenso lange im Blaulichtfeld bei 12 750 erg/cm ² sec. Anschließend an die Lichtgabe wurden die Proben in jeweils 10 ml HCl-Propanol extrahiert und in 5 cm Küvetten bei 546 nm gemessen.		
<u>isolierte Kotyledonen im monochromatischen Licht</u> (2 724 x 10 ¹² Quanten/cm ² sec)	<u>intakte Keimlinge im Blaulichtfeld</u> (bei 12 750 erg/cm ² sec)	
Filter	Extinktion	Extinktion
438 nm	E = 0,060	E = 0,150
	E = 0,055	E = 0,147
	E = 0,050	E = 0,140
666 nm	E = 0,003	
	E = 0,005	
	E = 0,005	
Dunkelkontrolle:		
	K = 0,004	K = 0,008

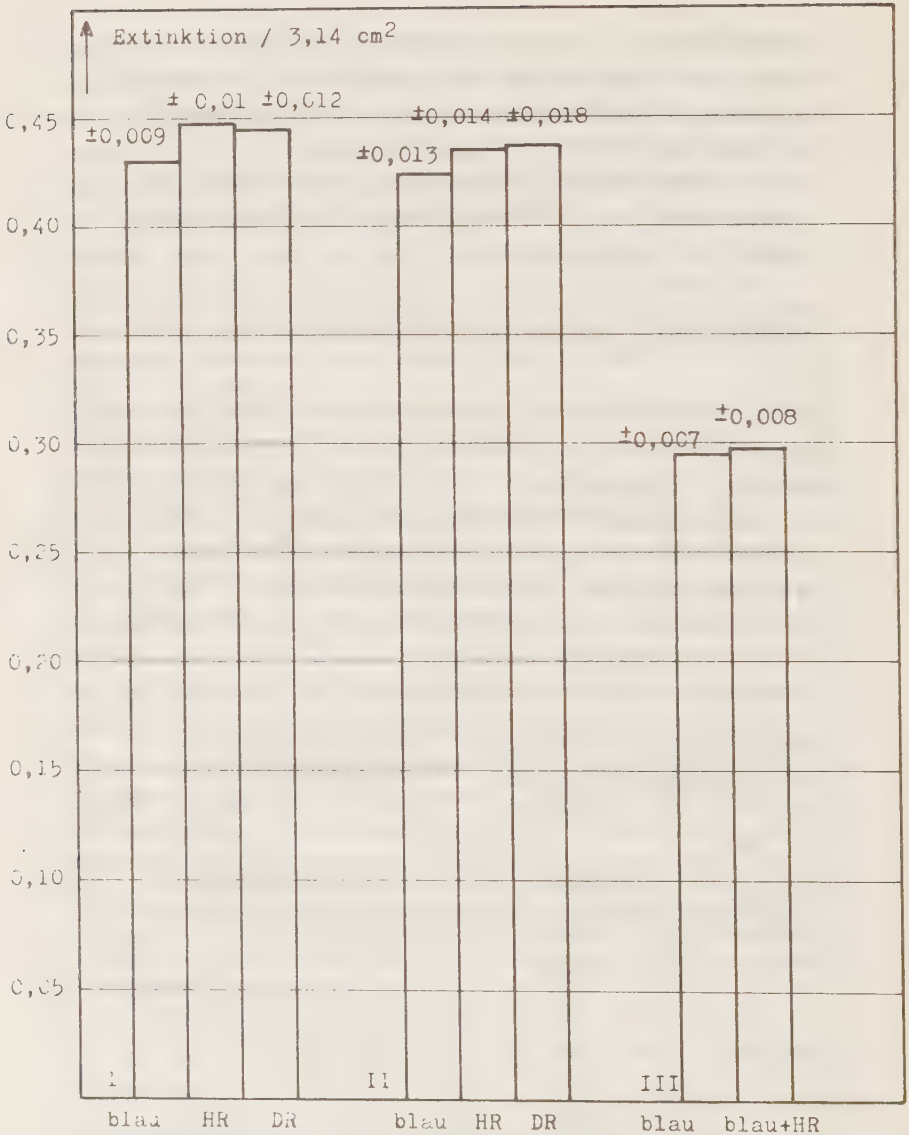


Abbildung 32: Untersuchung der Gewebekulturen auf Phytochrom-einfluß.

Die Darstellung zeigt die Mittelwerte aus jeweils 12 Versuchen und die mittleren Fehler. I = 24-stündige Blaublichtgabe $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ anschließend 15 Minuten 666 nm und 725 nm $1\,362 \times 10^{12}\text{ Qu/cm}^2\text{ sec}$, weiterhin 24 Stunden Dunkelbehandlung; II = 15 Minuten 666 bzw. 725 nm anschließend 24 Stunden Blaublicht

Für den Gipfel im Rotbereich des sichtbaren Lichtes im Wirkungsspektrum der abgetrennten Keimblätter ist demnach das photosynthetische System verantwortlich.

II. Rotlichtbestrahlungen

Das Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese der Gewebekulturen und Keimlinge von *Haplopappus gracilis* hatte ein Maximum bei 438 nm und wies daneben Aktivität im langwelligen Ultraviolett um 372 nm auf. Phytochrom konnte an der Induktion der Pigmentbildung in Gewebekulturen und intakten Keimlingen nicht beteiligt sein, weil Rotlicht vollkommen unwirksam war. Weitere Untersuchungen erbrachten auch keinen Hinweis darauf, daß das Phytochromsystem einen sekundären, fördernden oder hemmenden Einfluß auf die Anthocyansynthese von *Haplopappus gracilis* ausübt, wie er von D o w n s (1963) für *Sorghum vulgare* beschrieben wurde.

1. Gewebekulturen

Ausgangspunkt für diese Versuche war der zeitliche Ablauf der Pigmentsynthese in den Gewebekulturen. Er gliederte sich in drei voneinander trennbare Abschnitte. Auf eine lichtbedürftige Phase (I), auf die in einer anschließenden Dunkelperiode keine Pigmentbildung stattfinden konnte, folgte eine zweite, in der die Induktion zustande kam (II), die zur Anthocyansynthese während einer darauffolgenden Dunkelphase (III) führte.

und 24 Stunden Dunkelbehandlung; III = 100 000 erg Blau- und 10 000 erg Blau + 5 000 erg Hellrotlicht gleichzeitig. Die Ordinate gibt die Extinktion der Proben mit Ext./3,14 cm² an, die Abszisse ist ohne Dimension.

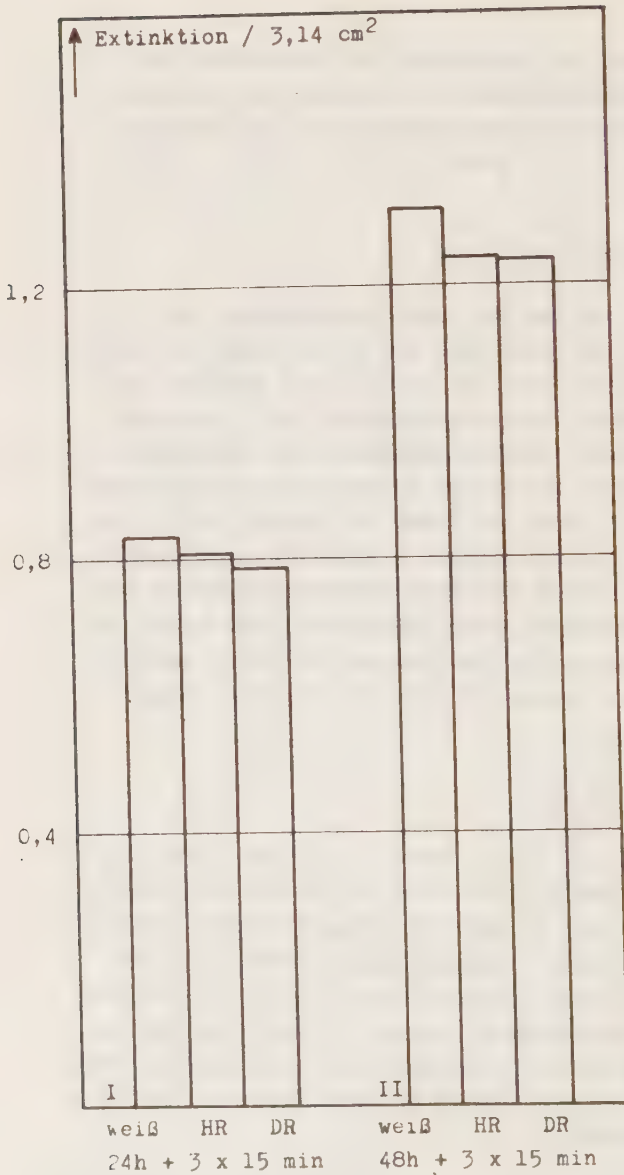


Abbildung 33: Phytochromversuche mit einem neuen Haplopappus-stamm.

Die Darstellung zeigt die Mittelwerte aus 10 Versuchen. Das verwendete Gewebe wurde in Suspensionskultur (White) gehalten, es war 12 Wochen vor Versuchsbeginn neu angesetzt worden.

I = 24-stündige Bestrahlung mit Weißlicht (20 000 erg/cm² sec)

Sollte Hell- oder Dunkelrot neben Blaulicht auf die Synthese einen Einfluß haben, so müßte festzustellen sein, in welchem Abschnitt der Pigmentbildung das Phytochromsystem eingegriffen hat. In einer Reihe von Versuchen wurden Hell- und Dunkelrotbestrahlungen vor und während der verschiedenen Phasen der durch Blaulicht induzierten, 24 Stunden dauernden Biosynthese des Anthocyans eingeschoben.

(I) PRÄINDUKTION — (II) INDUKTION — (III) DUNKELPHASE

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

Rot Rot Rot Rot Rot Rot

Auf bereits induzierte Anthocyansynthese hatte Rotlicht keinen Einfluß. Die im Dunkeln ablaufenden Vorgänge wurden nicht durch Phytochrom gestört. Rotlicht, vor der Bestrahlung mit Blaulicht gegeben, bewirkte ebensowenig eine Hemmung oder Förderung wie gleichzeitige Gabe von Hellrot- und Blaulicht (siehe Abbildung 32). In weiteren Versuchen wurden mehrere Rotlichtbestrahlungen in jeder Phase eingeschoben. Auch hier zeigte sich keine Phytochromreaktion, wie die Abbildung 33 zeigt.

Sämtliche Versuche sind mit frisch angesetztem Gewebe wiederholt worden, um den Verdacht zu entkräften, daß das seit mehreren Jahren in Kultur gehaltene zuerst verwendete Gewebe die Fähigkeit, auf Rotlicht zu reagieren, verloren habe. Auch Suspensionskulturen, die stärker auf Bestrahlung mit Blau-

und 3 mal eingeschobener Hell- (666 nm) und Dunkelrotlicht (725)-Gabe $1\,362 \times 10^{12}$ Qu/cm² sec; II = 48-stündige Bestrahlung und 5 eingeschobene 15 Minuten lange Hell- und Dunkelrotlichtgaben. Die Ordinate zeigt die Extinktion/3,14 cm², die Abszisse ist ohne Dimension.

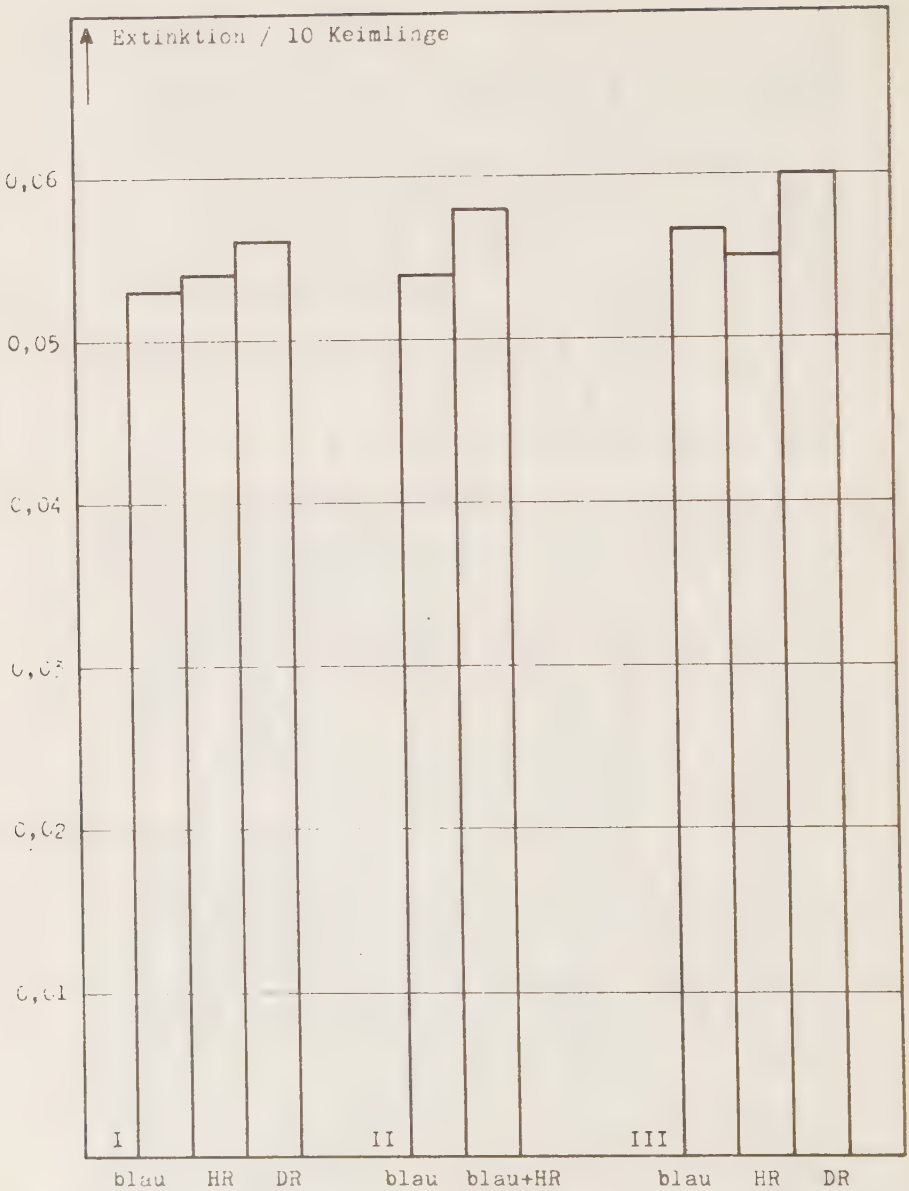


Abbildung 34: Phytochromversuche mit intakten Keimlingen.

Die Darstellungen sind Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen.

I = 15 Minuten Hell- bzw. Dunkelrot (666 und 725 nm, $1\,362 \times 10^{12}$ Qu/cm² sec) anschließend 24 Stunden Blaulicht $12\,750$ erg/cm² sec; II = $10\,000$ erg Blaulicht und $10\,000$ erg Blau- + $5\,000$

licht oder Weißlicht hoher Intensität reagieren als die auf Agarboden gehaltenen zuerst verwendeten Gewebe, zeigten keine Veränderung der durch Weißlicht induzierten Anthocyansynthese bei zusätzlicher Rotlichtgabe (siehe Abbildung 33).

2. Keimlinge

Auch bei Keimlingen von *Haplopappus gracilis* bewirkte Rotlicht keine Induktion der Anthocyansynthese, wenn sie unverletzt waren. Die Biosynthese war bei einer Blaulichtbestrahlung mit $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C nach 24 Stunden zum Teil abgeschlossen, das heißt, die Keimlinge enthielten nach dieser Behandlung bereits Anthocyan. Wurden vor und während einer solchen 24-stündigen Lichtperiode Hell- und Dunkelrotbestrahlungen eingeschoben, so trat keine Förderung oder Hemmung der Pigmentbildung ein. Das gleiche galt für eine gleichzeitige Blaulicht und Hellrotlichtgabe (siehe Abbildung 34).

erg Hellrotlicht während 24 Stunden; III = vor und 3 mal während 24-stündiger Blaulichtgabe 15 Minuten Hell- bzw. Dunkelrotlicht. Die Ordinate gibt die Extinktion/10 Keimlinge an, die Abszisse ist ohne Dimension.

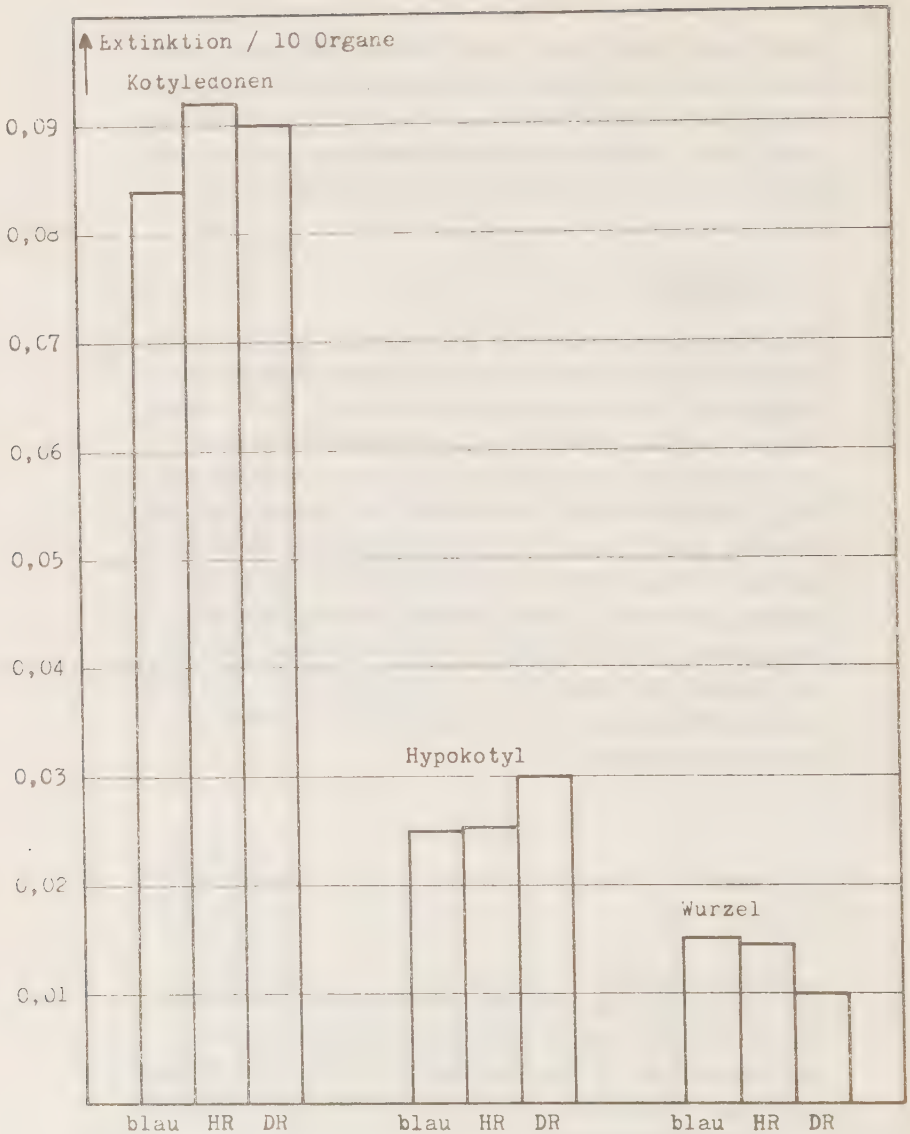


Abbildung 35: Phytochromversuche mit isolierten Organen von etiolierten Haplopappuskeimlingen.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils fünf Versuchen. Die Organe wurden vor der Bestrahlung isoliert und zu je 10 in einer Petrischale behandelt. Die Proben wurden einer 24-stündigen Blaubestrahlung bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ bei 28°C

Ebenso wie die intakten Pflanzen reagierten auch die einzelnen Organe nicht auf kurze Rotbestrahlungen niedriger Intensität, die vor und während einer Induktion durch Blaulicht gegeben wurden. Auch hier entsprachen die Extinktionswerte, die durch Blau- und Rotlicht erzielt wurden, immer den Kontrollen, die ausschließlich mit Blaulicht hoher Intensität behandelt worden waren (siehe Abbildung 35).

Auch für die Induktion der Anthocyansynthese durch Hellrotlicht in isolierten Kotyledonen waren Intensitäten von mehr als $10\,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ erforderlich. Wurden vor und während einer 5-tägigen Bestrahlung mit 666 nm der Intensität $2\,724 \times 10^{12} \text{ Qu/cm}^2 \text{ sec}$ alle 12 Stunden Dunkelrotgaben von 15 Minuten Dauer (725 nm) derselben Intensität eingeschoben, so war die Reaktion gegenüber der Hellrotkontrolle nicht verändert. Auch in diesem Fall scheint das Phytochrom nicht in die Anthocyansynthese einzugreifen (siehe Tabelle XXV).

ausgesetzt in die 5×15 Minuten Hell- bzw. Dunkelrotlichtgaben eingeschoben waren. Die Ordinate gibt die Extinktion/10 Organe (20 Kotyledonen) an, die Abszisse ist ohne Dimension.

Tabelle XXV: Phytochromversuche mit isolierten Kotyledonen

Kotyledonen von 10 Tage alten etioliierten Keimlingen wurden 5 Tage lang mit Hellrotlicht (666 nm) der Intensität $2\,724 \times 10^{12}$ Qu/cm² sec bei 28°C bestrahlt. I = alle 12 Stunden wurde eine Dunkelrotbestrahlung (725 nm) von 15 Minuten Dauer derselben Intensität eingeschoben; II = Die Kotyledonen blieben 5 Tage lang ausschließlich im Hellrotlicht. Ein Extinktionswert entspricht 20 extrahierten Kotyledonen.

	I. 5 Tage Hellrot + 10 x 15 min. 725 nm	II. 5 Tage Hellrot
Extinktion/ 20 Kotyledonen	E = 0,090 E = 0,098 E = 0,120 E = 0,092	E = 0,095 E = 0,110 E = 0,090 E = 0,096
Dunkelkontrolle:	K = 0,004	K = 0,003

DISKUSSION

Einheitlichkeit der Gewebe

Bevor die eigentlichen Versuchsergebnisse erörtert werden können, ist es notwendig, auf die angewendeten Untersuchungsmethoden näher einzugehen.

Haplopappusgewebe, das auf White'schem Medium kultiviert wurde, bildete bei Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität immer Anthocyan. Der Energiebedarf und die Dauer der Biosynthese war bei verschiedenen Stämmen unterschiedlich. Die beobachteten Unterschiede waren nur quantitativ. Sie lagen in der Stärke der Reaktion der Gewebe auf eine Bestrahlung bestimmter Dauer und Intensität. Diese Reaktionsfähigkeit erwies sich als eine Eigenschaft der einzelnen Stämme, die auch nach jahrelanger Kultivierung im Dunkeln nicht verloren ging.

Die Zellen in Gewebekulturen von Haplopappus gracilis sind nicht unbedingt genetisch stabil, es können Unterschiede in der Genomzahl auftreten (REINERT und TORREY 1961). Es ist möglich, daß die quantitativen Abweichungen bei verschiedenen Haplopappusstämmen auf einer Verschiedenheit der Genomzahl beruhen.

An den im Dunkeln wachsenden Kulturen ist nie eine Selektion hinsichtlich der Synthesefähigkeit unternommen worden. Lagen auch innerhalb eines Stammes verschiedene Zelltypen vor, so verteilten sie sich im Gewebe und wurden bei jeder Übertragung gleichmäßig weitergegeben. Daß keine vollkommen gleichmäßige Verteilung bestand, zeigten die hohen Schwankungen der Extinktionswerte, die bei Bestrahlung mit geringer Intensität beziehungsweise kurzer Lichtperiode auftraten. Hier machten

sich geringe Unterschiede im Gewebe stark bemerkbar. Zu einer einwandfreien quantitativen Aussage führten daher nur Versuche, in denen hohe Intensitäten bei längerer Bestrahlungsdauer gegeben wurden. Eine weitere Möglichkeit lag in der Verwendung eines sehr reaktionsfähigen Stammes.

Da der Farbstoff ausschließlich in den obersten Zellschichten auftrat, wurde die dem Licht ausgesetzte Oberfläche des Gewebes als Bezugsgröße für die gebildete Anthocyanmenge gewählt. Die Ursache dafür, daß im Inneren der Gewebeschicht kein Pigment synthetisiert werden konnte, lag darin, daß die Reaktion nur ^{bei} sehr hoher Lichtintensität ausgelöst werden konnte. Wurde die gefärbte Schicht entfernt oder die Petrischale umgedreht, so war das darunterliegende Gewebe bei Bestrahlung mit Blaulicht sofort in der Lage, Anthocyan zu bilden.

Ablauf der Anthocyansynthese

Die Biosynthese des Anthocyans in Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* bei Bestrahlung mit Blaulicht verlief in drei Abschnitten, die zeitlich voneinander getrennt werden konnten (siehe Seite 34).

PRÄINDUKTION ——— INDUKTION ——— BILDUNGSPHASE

Anschließend an die Präinduktion war keine Synthese des Farbstoffs im Dunkeln möglich. Erst während fortdauernder Lichtgabe erlangte das Gewebe in der Induktionsphase die Fähigkeit zur Pigmentbildung. Präinduktion und Induktion können zur Verzögerungsphase zusammengefaßt werden. Für diesen Ablauf des Prozesses sind zwei Erklärungen möglich.

Während der Präinduktionsphase werden durch eine Photoreaktion Vorstufen gebildet, die nicht direkt zur Synthese führen. Erst durch eine zweite lichtabhängige Reaktion in der Induktionsphase können die Voraussetzungen für eine Synthese im Dunkeln wie im Licht geschaffen werden.

In einer zweiten Erklärung gelten die beiden lichtbedürftigen Phasen als eine Einheit. In der Präinduktions- und Induktionszeit bringt eine einzige Art der Lichtreaktion Anthocyanvorstufen hervor. Erst wenn diese Substanzen in einem bestimmten Verhältnis oder in genügender Menge zur Verfügung stehen, kommt es zur Synthese des Anthocyans.

Bei fortdauernder Bestrahlung schloß sich an die Verzögerung ein linearer Anstieg der Pigmentbildung im Gewebe an, der mehrere Tage lang anhielt und zu einer Sättigung führte. Dieser Ablauf der Synthese deutet darauf hin, daß es zunächst während der Inkubationszeit zur Stabilisierung eines bestimmten Zustandes in den Zellen kommen muß. Ist das erreicht, kann die Biosynthese abgeschlossen werden. Dieser Zustand bleibt während der linearen Phase bestehen und stellt möglicherweise ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau von Vorstufen dar, das die Anthocyansynthese ermöglicht.

M o h r nimmt an, daß die Anthocyansynthese in Sinapiskeimlingen über eine differentielle Genaktivierung durch Phytochrom verläuft (MOHR 1966). Da die Biosynthese anderer Substanzen, wie Ascorbat (SCHOPFER und MOHR 1965) und Phenylalanin-desaminase (DURST und MOHR 1966a, b) eine ähnliche Kinetik zeigt wie die der Anthocyansynthese schließt M o h r auf eine Reihenfolge bei der Aktivierung der Gene durch Phytochrom, die eine Verzögerung der Pigmentbildung erklären könnte.

Eine Verzögerungsphase in der Pigmentbildung bei Bestrahlung wurde für alle bisher untersuchten Objekte beschrieben. Bei Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN 1963), Rüben (SIEGELMAN und HENDRICKS 1967), Äpfeln (SIEGELMAN und HENDRICKS 1958 a,b) und Spirodela (THIMANN und Mitarbeiter 1964) betrug die Inkubationszeit mehrere Stunden und ging, wie für Haplopappus beschrieben, einer linearen Phase voraus. Rotkohlkeimlinge, die auch im Dunkeln etwas Anthocyan bilden können, reagierten ohne Verzögerung auf die Bestrahlung (SIEGELMAN und HENDRICKS 1957).

Diese Verzögerungsphase ist nur an Äpfeln näher untersucht worden. Zur Induktion der Anthocyan-synthese sind bei diesem Objekt zwei Photoreaktionsschritte notwendig, für die offensichtlich der gleiche Rezeptor verantwortlich ist (SIEGELMAN und HENDRICKS 1958 b).

Temperatur

Ein Einfluß der Temperatur auf die Anthocyan-synthese im Haplopappusgewebe konnte für alle drei Phasen der Biosynthese nachgewiesen werden. Bei gleicher Intensität und Bestrahlungsdauer ergab sich während der Lichtperiode (Präinduktions- und Induktionsphase) zwischen 10 und 30°C eine Förderung der Pigmentbildung mit steigender Temperatur. Wurde das Gewebe anschließend an die Lichtphase bei niedriger Temperatur im Dunkeln gehalten (Dunkelphase), so führte diese Kältebehandlung zu einer Verlängerung der Bildungsdauer einerseits und zu einer Mehrsynthese andererseits. Bei einer Temperatur von 28°C dauerte die Bildungsphase im Dunkeln 16 Stunden, bei 15°C dagegen 48 Stunden. Die Förderung durch die Kältebehandlung betrug 30%.

S i e g e l m a n und H e n d r i c k s (1958b) haben ähnliche Verhältnisse für Äpfel beschrieben. Länge der Inkubationszeit und Ausmaß der Synthese waren auch bei diesem Objekt von der Temperatur während der Bestrahlung abhängig. Ebenso wie bei Gewebekulturen von Haplopappus förderten tiefe Temperaturen in Apfelschalen die Bildung des Pigments wenn sie anschließend an die Lichtperiode gegeben wurden. Auch Spirodela ist aus diesem Grunde anschließend an die Bestrahlung im Dunkeln bei niedriger Temperatur weiterbehandelt worden (THIMANN und Mitarbeiter 1964).

Es ist wahrscheinlich, daß der Temperatureffekt während der Lichtperiode über eine allgemeine Steigerung der Stoffwechselaktivität wirksam wurde. Die für den Aufbau der Vorstufen notwendigen energiereichen Verbindungen wie ATP standen bei stärkerem Umsatz in größerem Maße zur Verfügung und konnten in die Synthese eingreifen. K a n d e l e r (1960) ersetzte durch Fütterung von ATP an Rotkohlkeimlinge einen Teil der Lichtwirkung.

Der Kälteeffekt wird mit einer Freisetzung von Zucker durch Verminderung der Atmungsintensität und Anhäufung in den Zellen infolge von Stärkeabbau bei niedrigen Temperaturen erklärt (JEREMIAS 1958, WOLF 1958). Dem Haplopappusgewebe stand aus dem Nährmedium jederzeit genügend Zucker zur Verfügung. Es ist nicht anzunehmen, daß Zuckermangel der limitierende Faktor der Pigmentbildung der Gewebe im Dunkeln war. Wahrscheinlicher ist, daß infolge der allgemeinen Verminderung des Stoffwechsels bei tiefer Temperatur auch die Biosynthese des Anthocyans in der Dunkelphase verlangsamt wurde. Weiterhin scheint es, als ob Anthocyanvorstufen, die bei höherer Temperatur auch anderen Synthesevorgängen

zufließen konnten, durch die Kältebehandlung vermehrt der Anthocyanbildung zur Verfügung standen.

Offensichtlich haben alle Pflanzen eine für die Anthocyan synthese optimale Temperatur. B l a n k (1958) nimmt an, daß sich das Optimum für die Vorgänge während der Bestrahlung mit dem des jeweiligen Stoffwechsels deckt. So wurden auch für die verschiedenen Objekte unterschiedliche Versuchstemperaturen gewählt. Die unterste Grenze für Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN 1963) war 5°C , das Optimum 20°C . Die entsprechenden Werte für Rüben (SIEGELMAN und HENDRICKS 1957) waren 5° und 15°C . Die Versuche mit Rotkohlkeimlingen wurden von K a n d e l e r (1960) hauptsächlich bei der für dieses Objekt optimalen Temperatur von 25°C unternommen. Bei Keimlingen von *Haplopappus gracilis* lag die Temperatur für die höchste Ausbeute an Pigment bei 28°C .

Intensität

Um in den Gewebekulturen von *Haplopappus* eine Induktion der Anthocyan synthese hervorzurufen, mußte die Lichtenergie dem Gewebe in einer bestimmten Zeit gegeben werden. Entscheidend war also nicht die Dosis, sondern die Intensität der Lichtgabe. Die unterste Grenze der Wirksamkeit lag bei $2\,550\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$. Nach einer Präinduktion bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ reichte ein Zehntel dieser Energie aus, um die Induktion herbeizuführen. Läge die Induktion in einer zweiten Photoreaktion begründet, so wäre dieser Prozeß sehr wenig energiebedürftig. Die Induktionsphase war aber, wie die Versuchsergebnisse zeigen, ebenfalls intensitätsabhängig. Es ist wahrscheinlicher, daß es sich bei diesem Schritt um die Überwindung eines Schwellenwertes handelt, also um eine Ergänzung

S i e g e l m a n und H e n d r i c k s (1958b) haben ähnliche Verhältnisse für Äpfel beschrieben. Länge der Inkubationszeit und Ausmaß der Synthese waren auch bei diesem Objekt von der Temperatur während der Bestrahlung abhängig. Ebenso wie bei Gewebekulturen von Haplopappus förderten tiefe Temperaturen in Apfelschalen die Bildung des Pigments wenn sie anschließend an die Lichtperiode gegeben wurden. Auch Spirodela ist aus diesem Grunde anschließend an die Bestrahlung im Dunkeln bei niedriger Temperatur weiterbehandelt worden (THIMANN und Mitarbeiter 1964).

Es ist wahrscheinlich, daß der Temperatureffekt während der Lichtperiode über eine allgemeine Steigerung der Stoffwechselaktivität wirksam wurde. Die für den Aufbau der Vorstufen notwendigen energiereichen Verbindungen wie ATP standen bei stärkerem Umsatz in größerem Maße zur Verfügung und konnten in die Synthese eingreifen. K a n d e l e r (1960) ersetzte durch Fütterung von ATP an Rotkohlkeimlinge einen Teil der Lichtwirkung.

Der Kälteeffekt wird mit einer Freisetzung von Zucker durch Verminderung der Atmungsintensität und Anhäufung in den Zellen infolge von Stärkeabbau bei niedrigen Temperaturen erklärt (JEREMIAS 1958, WOLF 1958). Dem Haplopappusgewebe stand aus dem Nährmedium jederzeit genügend Zucker zur Verfügung. Es ist nicht anzunehmen, daß Zuckermangel der limitierende Faktor der Pigmentbildung der Gewebe im Dunkeln war. Wahrscheinlicher ist, daß infolge der allgemeinen Verminderung des Stoffwechsels bei tiefer Temperatur auch die Biosynthese des Anthocyans in der Dunkelphase verlangsamt wurde. Weiterhin scheint es, als ob Anthocyanvorstufen, die bei höherer Temperatur auch anderen Synthesevorgängen

zufließen konnten, durch die Kältebehandlung vermehrt der Anthocyانبildung zur Verfügung standen.

Offensichtlich haben alle Pflanzen eine für die Anthocyansynthese optimale Temperatur. B l a n k (1958) nimmt an, daß sich das Optimum für die Vorgänge während der Bestrahlung mit dem des jeweiligen Stoffwechsels deckt. So wurden auch für die verschiedenen Objekte unterschiedliche Versuchstemperaturen gewählt. Die unterste Grenze für Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN 1963) war 5°C , das Optimum 20°C . Die entsprechenden Werte für Rüben (SIEGELMAN und HENDRICKS 1957) waren 5° und 15°C . Die Versuche mit Rotkohlkeimlingen wurden von K a n d e l e r (1960) hauptsächlich bei der für dieses Objekt optimalen Temperatur von 25°C unternommen. Bei Keimlingen von *Haplopappus gracilis* lag die Temperatur für die höchste Ausbeute an Pigment bei 28°C .

Intensität

Um in den Gewebekulturen von *Haplopappus* eine Induktion der Anthocyansynthese hervorzurufen, mußte die Lichtenergie dem Gewebe in einer bestimmten Zeit gegeben werden. Entscheidend war also nicht die Dosis, sondern die Intensität der Lichtgabe. Die unterste Grenze der Wirksamkeit lag bei $2\,550\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$. Nach einer Präinduktion bei $12\,750\text{ erg/cm}^2\text{ sec}$ reichte ein Zehntel dieser Energie aus, um die Induktion herbeizuführen. Läge die Induktion in einer zweiten Photoreaktion begründet, so wäre dieser Prozeß sehr wenig energiebedürftig. Die Induktionsphase war aber, wie die Versuchsergebnisse zeigen, ebenfalls intensitätsabhängig. Es ist wahrscheinlicher, daß es sich bei diesem Schritt um die Überwindung eines Schwellenwertes handelt, also um eine Ergänzung

der Prozesse, die in der Präinduktionsphase stattfinden. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann aber mit den vorliegenden Ergebnissen nicht getroffen werden.

Nach Überwindung der Verzögerungsphase stand die Anthocyanbildung in einer direkten Relation zur Intensität. Das gilt auch für alle bisher untersuchten Objekte. Auch die Abhängigkeit der Inkubationsdauer von der Lichtenergie wurde für alle daraufhin untersuchten pflanzlichen Gewebe beschrieben. Bestrahlungsdauer und Intensität sind, wenn eine Verzögerungsphase auftritt, nicht gegeneinander austauschbar. Es wird vermutet, daß bei mangelnder Energie die Anthocyanvorstufen ebenso schnell wieder abgebaut wie synthetisiert werden (KANDELER 1960, DOWNS und SIEGELMAN 1957, 1958 a).

An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß die Synthese des Anthocyans in den Gewebekulturen immer mindestens 24 Stunden dauerte. Intensitäten zwischen 12 000 und 90 000 $\text{erg/cm}^2 \text{ sec}$ konnten diese Dauer der Pigmentbildung nicht beeinflussen. Das deutet auf langwierige Umsetzungen in der Biosynthese des Anthocyans, die zeitlich hinter der intensitätsabhängigen Lichtreaktion liegen, die nachweislich zum Teil schon nach 9 Stunden (bei 12 750 $\text{erg/cm}^2 \text{ sec}$) beendet war.

Zucker

Unter den physiologischen Voraussetzungen für die Anthocyan synthese nimmt der Zuckerhaushalt eine wichtige Rolle ein. In allen daraufhin untersuchten Objekten konnte durch Zuckerfütterung die Pigmentbildung gesteigert werden. Allgemein wird gesagt, daß die Bedingungen, die zu einer Anhäufung

von Kohlenhydraten im Gewebe führen, auch die Anthocyan synthese fördern.

Das normale White'sche Medium hat eine für das Wachstum der Kulturen optimale Konzentration von 2% Saccharose. Bei einem Gewebe, das bei diesem Zuckerangebot im Dunkeln kein Anthocyan bildet, ist nicht zu erwarten, daß der limitierende Faktor der Pigmentsynthese der Energielieferant ist. So führte denn auch eine Fütterung von 4% Saccharose und auch eine Verminderung auf 0,5% nicht zu einer Änderung der Synthesefähigkeit.

Wurde dem Nährboden die Saccharose vollständig entzogen, so ergab diese Maßnahme eine sofortige vollständige Hemmung der Anthocyanbildung, die durch Fütterung von Saccharose ebenso schnell wieder aufgehoben werden konnte. In diesem Fall handelte es sich sicher um ein Einstellen jeglicher synthetischer Tätigkeit im Gewebe.

Die Untersuchungen an Keimlingen von *Haplopappus gracilis* ergaben ähnliche Resultate. Pflanzen, die auf zuckerlosem Medium angezogen worden waren, bildeten bei Bestrahlung mit Blaulicht nur wenig Anthocyan und die Synthesefähigkeit erlosch nach etwa 14 Tagen vollkommen. Keimlinge, die auf einem Nährboden wuchsen, der 2% Saccharose enthielt, blieben zwar im Dunkeln ebenfalls ungefärbt, lieferten aber bei Bestrahlung bedeutend mehr Farbstoff und die Synthesefähigkeit war auch nach 3 - 4 Wochen nicht vermindert. Primärblättchen und Epikotyl bildeten ebenso Anthocyan, wie der übrige Teil der Pflanze.

Hier wurde ähnlich wie bei den Gewebekulturen die Synthese erst dann eingestellt, wenn der Energielieferant aus dem Samen vollständig aufgebraucht

war. Stand genügend Zucker aus dem Nährmedium zur Verfügung, so verloren die Keimlinge von Haplopappus nicht die Fähigkeit, Anthocyan zu bilden.

In Gewebekulturen von Haplopappus waren Glucose und Fruktose ebenso wirksam wie Saccharose. B l a n k (1951) und P a e c h und E b e r h a r d t (1952) beobachteten an Rotkohlkeimlingen einen Anstieg des Anthocyangehaltes nach Zugabe von Glucose. In Lepidium-keimlingen förderte neben Glucose auch Galaktose, Sorbose und Arabinose die Anthocyanbildung (EDDY und MAPSON 1951). Dagegen fanden T h i m a n n und E d m o n d s o n (1949), daß bei Spirodela oligorhiza Saccharose am meisten, Fruktose, Laktose, Galaktose und Sorbitol etwas und Glucose gar nicht steigerten.

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß die zum Teil ungewöhnlichen Zucker nicht als solche, sondern erst nach Aufschließung durch glycolytische Prozesse in die Anthocyansynthese eingehen. E b e r h a r d t (1954) konnte zeigen, daß der Zucker in Rotkohlkeimlingen nicht als Lieferant von Anthocyanvorstufen wirksam wird, sondern vielmehr durch die indirekt über die verschiedenen Abbaureaktionen zustande kommende Lieferung energiereicher Phosphatverbindungen, die für die Synthese benötigt werden.

Stickstoff

Nährböden nach White (WHITE 1954) und Skoog (MURASHIGE und SKOOG 1962) unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Nährsalze mit dem Schwerpunkt im Stickstoffgehalt. Skoog'sche Salze enthalten bedeutend mehr Kaliumnitrat und im Gegensatz zu den Whitesalzen auch Ammoniumnitrat.

Haplopappusgewebe, das auf White'schem Medium angezogen und kultiviert worden war, wuchs langsam (in 14 Tagen um 200%) und bildete bei Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität immer Anthocyan. Dagegen wies Gewebe, welches auf Skoog'schem Nährboden gehalten wurde eine Wachstumsrate von 2 000% in 14 Tagen auf und war zur Pigmentsynthese im Blaulicht nicht fähig. Durch Umsetzen dieser Kulturen auf White'sches Medium konnten auch sie zur Anthocyanbildung veranlaßt werden. Zugleich wurde das Wachstum der Gewebe stark eingeschränkt.

Durch Zugabe von Nitrat oder Glutaminsäure zum White'schen Nährboden konnte die Anthocyan synthese je nach Konzentration und Einwirkungs dauer ganz oder zum Teil gehemmt werden. Nach Entzug des Stickstoffs war das Gewebe nach einiger Zeit wieder in der Lage, bei Bestrahlung mit Blaulicht Anthocyan zu bilden.

Seit langem wird vermutet (ONSLOW 1931, FREY-WYSSLING 1938), daß das Anthocyan in der Pflanze im Zuge des Eiweißabbaus aus den übriggebliebenen, desaminierten Kohlenstoffgerüsten der Aminosäuren gebildet wird. 1958 konnte E b e r h a r d t feststellen, daß eine Konkurrenz zwischen der Bildung von Protein und der des Anthocyan besteht.

Z u c k e r (1965) sowie N i t s c h und N i t s c h (1966) fanden, daß das Enzym Phenylalanindesaminase, das Phenylalanin zu Zimtsäure desaminiert, in Kartoffelgewebe in verstärktem Maße unter Lichteinwirkung gebildet wird. In beiden Fällen lief eine Anthocyan synthese parallel ab. Die lichtinduzierten Synthesen des Enzyms wie des Anthocyan wurden durch den Blauanteil des Spektrums aktiviert. Dagegen stellten D u r s t und M o h r (1966 a,b) eine Aktivierung der Phenylalanindesaminase im Senfkeimling durch Rotlicht

fest. Bei Experimenten mit Buchweizen (SCHERF und ZENK 1967) ergab sich, daß die Phenylalanin-desaminase für die Reaktionsrichtung des Phenylalanins zu Protein oder Phenylpropanderivaten und damit auch für die Bildung des Ringes B der Anthocyane entscheidend ist.

In diese Richtung weisen auch Versuchsergebnisse an Haplopappusgewebe. Auf stickstoffarmem Mangelmedium (White) stehen mögliche Vorstufen der Anthocyanbildung zur Verfügung, die bei genügender Versorgung mit Stickstoff (Skoog) in der Proteinsynthese (Wachstum) verbraucht werden.

Gibberellinsäure

In physiologischen Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-6} g/ml hatten die Wachstumsregulatoren Kinetin, IES und 2,4-D keinen Einfluß auf die Anthocyan-synthese der Gewebekulturen von Haplopappus gracilis. Gibberellinsäure (GA_3) hemmte dagegen die Pigmentbildung sehr stark und nach kurzer Einwirkungs-dauer.

Die Hemmung der Anthocyan-synthese durch Gibberellinsäure wurde sofort wirksam und hielt tagelang nach Entzug des Hormons an. Sie konnte jedoch durch längere Bestrahlungsdauer zum Teil wieder aufgehoben werden. Dieser Antagonismus zwischen Licht- und Gibberellinwirkung deutet darauf hin, daß nicht die Photoreaktion gehemmt wurde. Es scheint, als ob die bei der Lichtreaktion gebildeten Substanzen nicht mehr der Anthocyan-synthese zugeführt werden. Bei fort-dauernder Bestrahlung entsteht ein solches Überangebot dieser Stoffe, daß die Pigmentbildung zu einem geringen Teil doch zustande kommen kann. Für diese Vermutung spricht auch der Befund, daß Gibberellin die Dunkelreaktion und damit die Anthocyan-

bildung verhinderte, wenn es anschließend an die Lichtperiode gegeben wurde, die Photoreaktion also vorher ungestört ablief.

F u r u y a und T h i m a n n (1964) fanden ähnliche Ergebnisse für *Spirodela oligorhiza*. Auch hier konnte wie bei *Haplopappus*gewebe die Hemmung durch weitere Bestrahlung zum Teil wieder aufgehoben werden. Es wird vermutet, daß das Licht und die Gibberellinsäure antagonistische Funktionen ausüben. Da die Anthocyansynthese durch eine instabile RNS kontrolliert wird (THIMANN und RADNER 1962, 1963), nehmen die Autoren an, daß das Gibberellin bei *Spirodela* auf eine Nukleinsäure einwirkt.

Keimlinge

Die Voraussetzungen für die Anthocyansynthese der Keimlinge stimmten mit denen der Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* weitgehend überein. Auch hier fanden sich starke Abhängigkeit von der Intensität, Temperaturempfindlichkeit der Reaktion und eine Synthesedauer von 24 Stunden. Es wurde bereits gesagt, daß Zucker für die Pigmentbildung unbedingt notwendig war und daß der Verlust der Synthesefähigkeit der Keimlinge durch Fütterung von Zucker verhindert werden konnte.

G r i l l und V i n c e (1965) stellten fest, daß Rübenkeimlinge in den Kotyledonen die für die Anthocyansynthese notwendigen Substanzen bilden und daß im Hypokotyl nach der Isolierung der Keimblätter kaum noch Anthocyan auftritt. Sie vermuten, daß die Synthese in den Kotyledonen beginnt, wo eine lichtabhängige Reaktion zur Bildung einer Zwischenstufe notwendig ist. Diese Substanz wird in das Hypokotyl

transportiert, wo eine zweite photochemische Reaktion für die Anthocyan synthese notwendig ist. Wird der Transport verhindert, findet die Pigmentbildung nur in den Kotyledonen statt.

Zu ähnlichen Ergebnissen führen auch Versuche mit *Sinapis alba* (HAVESTANGE und SCHUMACKER 1966) und *Celosia plumosa* (MALAVIYA und LALORAYA 1966).

Die Organe von *Haplopappus gracilis* waren in der Lage, unabhängig voneinander Anthocyan zu produzieren. Während Hypokotyl und Wurzel etwa gleich viel bildeten wie in der intakten Pflanze, stieg der Pigmentgehalt der isolierten Kotyledonen gegenüber denen an der unverletzten Pflanze um das Zwei- bis Dreifache. Mit der Dauer der Bestrahlung kam es in den abgetrennten Organen zu einem Anstieg der Anthocyanbildung. Wie in den intakten Keimlingen trat nach etwa 5 Tagen eine Sättigung ein. Der Anthocyangehalt der Kotyledonen lag bei gleicher Behandlung immer über dem der ganzen Pflanze.

Diese Abhängigkeit der Anthocyanmenge von der Dauer der Bestrahlung in Hypokotyl und Wurzel deutet darauf hin, daß auch in diesen Organen Vorstufen gebildet werden können. Durch die vorliegenden Versuchsergebnisse kann aber die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß diese Substanzen in gebundener Form bereits vorlagen und nach und nach für die Anthocyan synthese zur Verfügung standen.

Die Steigerung der Pigmentbildung in den Kotyledonen durch die Isolierung war eine Reaktion auf die Verwundung. Der Effekt zeigte sich auch nach Abtrennen der Wurzel. Außerdem stieg der Anthocyangehalt nach der Isolierung eines Keimblattes auch in dem an der Pflanze verbliebenen. Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Synthese in den Kotyledonen

nach der Abtrennung dadurch gefördert wurde, daß bestimmte Vorstufen in der Biosynthese des Anthocyans nicht an das Hypokotyl abgegeben werden konnten.

In der Literatur werden viele Beispiele über Induktion und Förderung der Anthocyanbildung durch Verletzung von Pflanzen angeführt. Es wird allgemein angenommen, daß es sich dabei um eine Störung im normalen Stoffwechsel der Pflanze handelt, die unter anderem die Steigerung der Anthocyan synthese hervorruft.

Wirkungsspektrum

Wenn bei einer Reihe von Pflanzen für den gleichen physiologischen Prozeß eine Lichtförderung nachgewiesen worden ist, ist damit noch nicht sicher, daß das Licht seine Wirkung in allen Fällen auch über die gleichen Primär- und Sekundärreaktionen entfaltet hat. In der Tat zeigt das Wirkungsspektrum der Anthocyan synthese bei nahezu jedem untersuchten Objekt einen anderen Verlauf. An dem Zustandekommen der Lichtwirkung scheinen also von Pflanze zu Pflanze, entgegen den Hypothesen von M o h r (1957) und H e n d r i c k s (1959, 1960), verschiedene Pigmente beziehungsweise Pigmentsysteme beteiligt zu sein.

Für die Anthocyan synthese der Gewebekulturen und Keimlinge von *Haplopappus gracilis* war Licht unbedingt erforderlich. Die Untersuchung der wirk samen Spektralbereiche ergab eine weitgehende Übereinstimmung der Wirkungsspektren beider Objekte. In beiden Fällen war die Aktivität auf den kurzwelligen Teil beschränkt, Rotlicht wirkte nicht induzierend.

Die Wirkungsspektren sind zweigipflig mit einem Maximum bei 438 und einem weiteren um 372 nm. Die Pigmentbildung sinkt um 400 nm auf ein Minimum ab. Die Dauer der Synthese und die Energiebedürftigkeit der Reaktion stimmte im UV- und Blaubereich überein. Daraus muß geschlossen werden, daß beide Aktivitätsmaxima von einem Photorezeptor hervorgerufen worden sind. Das Wirkungsspektrum der Anthocyansynthese von Haplopappus ähnelt dem Absorptionsspektrum der Flavine. Daher ist es wahrscheinlich, daß der für die Induktion der Anthocyansynthese verantwortliche Photorezeptor dieser Stoffgruppe angehört.

Im Gegensatz zu den inaktiven Pflanzen bildeten isolierte Kotyledonen und verletzte Keimlinge bei Bestrahlung mit Rotlicht hoher Intensität Anthocyan. Die Verletzung führte nicht zu einer Pigmentbildung im Dunkeln. Das Anthocyan trat nur in den chlorophyllhaltigen Keimblättern auf. Bestrahlung mit monochromatischem Licht zeigte, daß isolierte Kotyledonen im gesamten Bereich des sichtbaren Lichtes Pigment bilden konnten. Das Wirkungsspektrum hat ein deutliches Maximum um 440 nm und ein weiteres bei 660 nm. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Photoinduktion in verletzten Keimlingen zumindest im Grün- und Rotbereich über das Chlorophyll erfolgte. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß isolierte Kotyledonen von gelegentlich auftretenden nicht ergrünungsfähigen Pflanzen wohl im Blaulicht, nie jedoch im Rotlicht Anthocyan bildeten.

Durch die Verletzung wird der normale Stoffwechsel der Pflanze gestört. N i t s c h und N i t s c h (1966) geben an, daß Topinambour nur nach Verletzung Phenylalanin-desaminase bildet und daß diese Synthese durch Licht stark gefördert wird. Ähnlich mögen auch

in verletzten Keimlingen von Haplopappus veränderte Bedingungen für die Anthocyansynthese vorliegen. Die Zellen werden befähigt über einen weiteren Photorezeptor zur Induktion der Anthocyansynthese zu gelangen.

Die Anthocyanbildung der verletzten Keimlinge und isolierten Kotyledonen im Rotlicht konnte durch den Photosynthesehemmstoff DCMU vollständig verhindert werden, während sie im Blaulicht ungehindert ablief. Auch die Pigmentsynthese von intakten Keimlingen und Gewebekulturen im Blaulicht wurde durch DCMU nicht beeinflusst. Diese Versuchsergebnisse machen wahrscheinlich, daß der Gipfel im Rotbereich des Wirkungsspektrums der isolierten Kotyledonen durch das photosynthetische System hervorgerufen worden ist. Dagegen kann die Aktivität im Blaubereich nicht auf Chlorophyll zurückgeführt werden. Hier wurde offensichtlich derselbe Photorezeptor wirksam, der für die Anthocyansynthese von Gewebekulturen und intakten Keimlingen verantwortlich ist. Das Wirkungsspektrum der isolierten Kotyledonen zeigt also die Aktivitätsmaxima von zwei Rezeptoren, dem Flavin im Blaubereich und dem Chlorophyll im Rotbereich des sichtbaren Lichtes.

Auch bei der Anthocyanbildung in Äpfeln ist das Chlorophyll beteiligt, wie neuere Untersuchungen zeigen. Die Ideainsynthese in Apfelschalen wird von zwei Pigmentsystemen gesteuert, von denen das eine bei 430 - 480 nm und 650 nm mit hohem Energiebedarf, das andere bei 660 und 730 nm mit geringem Energiebedarf wirksam wird. Downs, Siegelman, Butler und Hendricks (1965) zeigten, daß für die energiebedürftige Reaktion das photosynthetische System verantwortlich ist. Sie konnte im Blau- wie im Rotbereich mit DCMU vollständig

gehemmt werden. Die zweite Reaktion wird durch Phytochrom hervorgerufen. In früheren Arbeiten hatten Siegelman und Hendricks (1958 a,b) als Photorezeptor für die lichtinduzierte Anthocyansynthese in Apfelschalen ein Flavoprotein angenommen.

Wie im intakten Keimling, so konnte auch die Photoreaktion in den isolierten Kotyledonen im Blau- wie im Rotbereich nur durch Licht hoher Intensität induziert werden. Auch hier bildete sich erst nach 24 Stunden Anthocyan, obwohl die Chlorophyllbildung im Rotlicht bereits nach wenigen Stunden abgeschlossen war. Weiterhin sind die Gipfel des Wirkungsspektrums der isolierten Kotyledonen etwa gleich hoch. All das deutet darauf hin, daß sich die Reaktionsketten der Biosynthese des Anthocyans in den beiden Spektralbereichen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Es ist denkbar, daß das durch Rotlicht angeregte Chlorophyll seine Energie in einer ähnlichen Reaktion überträgt wie das Flavin. Auf diese Weise ist zwar das Chlorophyll der Photorezeptor, die Reaktionsschritte der Biosynthese des Anthocyans würden jedoch nicht wesentlich verändert. Da das Photosynthesesystem erst nach Verwundung des Keimlings als Photorezeptor in die Anthocyanbildung eingreifen kann, ist aber anzunehmen, daß das Chlorophyll mit einer Substanz reagiert, die in der intakten Pflanze nicht zur Verfügung steht. Das würde bedeuten, daß die beiden Reaktionswege zumindest teilweise parallel verlaufen. An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß die Verwundung die normale Reaktionskette, die durch Blaulicht induziert wird, nicht unterbricht. Durch DCMU wurde auch im verletzten Keimling die Blaulichtreaktion nicht beeinträchtigt. Sie verlief also unverändert über das Flavin. Auf welche Weise die Ver-

letzung der Pflanze diesen Syntheseweg über das Chlorophyll ermöglicht, bleibt völlig ungeklärt.

Zweigipflige Wirkungsspektren der Anthocyanthese mit hohem Energiebedarf, die ein Maximum im Blau- und ein weiteres im Rotbereich des sichtbaren Lichtes aufweisen, finden sich bei verschiedenen Objekten. In keinem dieser Fälle scheint Chlorophyll der Photorezeptor zu sein. Eine hauptsächliche Förderung durch Rotlicht ergab sich für Rotkohlkeimlinge durch Bestrahlung mit 700 nm, für Rüben durch 620 nm und 725 nm (SIEGELMAN und HENDRICKS 1957). Daneben bestand für beide Objekte ein flacher Gipfel um 450 bis 470 nm. Sinapis bildet hauptsächlich bei 710 nm Anthocyan und hat ein weiteres Maximum bei 450 nm (MOHR 1957). Spirodela reagiert im ultraviolettten Licht bei 300 nm und im langwelligen Rotlicht um 700 nm (THIMANN und Mitarbeiter 1964). Auch das Wirkungsspektrum des Buchweizens (MOHR und VAN NES 1963) hat Maxima der Aktivität sowohl im kurzwelligen als auch im langwelligen Bereich des sichtbaren Lichtes. Lediglich Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN 1963) und Impatiens (ARNOLD 1962) bilden wie Gewebekulturen und intakte Keimlinge von Haplopappus gracilis nur bei Bestrahlung mit Blaulicht hoher Intensität Anthocyan.

Bei der Unterschiedlichkeit der Wirkungsspektren kann nicht angenommen werden, daß es sich in allen Fällen um denselben Photorezeptor handelt. Es ist auch nicht sicher, ob bei jeder Pflanze dieselbe Photoreaktion zustande kommt. Das Beispiel der isolierten Kotyledonen von Haplopappus zeigt, daß sogar in einem Objekt zwei verschiedene Rezeptoren mit hohem Energiebedarf die Anthocyanthese induzieren können.

Phytochrom

Zu diesen durch Licht hoher Intensität ausgelösten Photoreaktionen kommt in einigen Fällen eine Wirkung von Hell- und Dunkelrotlicht geringer Intensität hinzu. Bei Rotkohlkeimlingen (SIEGELMAN und HENDRICKS 1957), Äpfeln (DOWNS und SIEGELMAN 1965), Sinapiskeimlingen (MOHR 1957), Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN 1963) und Rübenkeimlingen (GRILL 1965) ließ sich die Synthese durch Einwirkung des Phytochromsystems reversibel fördern und hemmen.

Bei Rotkohl, Sinapis und Äpfeln kompliziert dieser Phytochromeinfluß das Wirkungsspektrum der hochenergiebedürftigen Reaktion, da die Hauptgipfel der Aktivität dieser Objekte im gleichen Wellenlängenbereich liegen. Es war daher schwer festzustellen, ob als Photorezeptor für diese Reaktion ebenfalls das Phytochromsystem fungierte. Spirodela hat ebenfalls ein Aktionsmaximum im Rotlicht hoher Intensität, reagiert aber nicht auf geringe Energiegaben bei 660 und 735 nm. Damit scheidet Phytochrom in diesem Fall als Photorezeptor mit großer Wahrscheinlichkeit aus.

Bei Sorghum und Amaranthus (HEATH und VINCE 1962) ist nur Blaulicht bei der Induktion der Anthocyan-synthese wirksam. Hier ist Phytochrom sicher nicht der Photorezeptor für die Primärreaktion. Auch ein Pigmentsystem, nach der Art wie M o h r (1957) es nach seinen Untersuchungen an Sinapis für alle hochenergiebedürftigen Lichtreaktionen dieser Art annahm muß ausgeschlossen werden, da es eine Wirkung von Rotlicht neben einem Blaulichteinfluß fordert. Über seine Hypothese von der differentiellen Genaktivierung kommt M o h r (1966) zu der Auffassung, daß auch die Dunkelrotbande der Hochenergiereaktion

bei der Anthocyansynthese der Senfkeimlinge auf eine Funktion des Phytochromsystems zurückzuführen ist. H a r t m a n n (1966) stellt die Hypothese auf, daß die hochenergiebedürftige Reaktion bei der Samenkeimung und der Hypokotylstreckung von *Lactuca sativa* aus einer Oscillationsanregung des P_{DR} resultiert. Das gilt sowohl für den Blau- wie auch für den Dunkelrotbereich des Spektrums.

In Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* und in intakten Keimlingen fand nie eine Induktion der Anthocyansynthese durch Rotlicht statt. Die Aktivität im langwelligen Bereich bei isolierten Kotle-donen ließ sich einwandfrei auf einen Einfluß des Photosynthesesystems zurückführen. Bereits induzierte Anthocyanbildung konnte nicht durch Hell- und Dunkelrotlicht geringer Intensität beeinflusst werden. Das galt für alle Phasen der Pigmentsynthese in den Gewebekulturen. Das galt auch für die durch Blaulicht induzierte Reaktion der Keimlinge. Auch die isolierten Organe reagierten nicht auf geringe Dosen von Hell- und Dunkelrotlicht.

Obwohl bisher in fast allen daraufhin untersuchten Objekten Phytochromwirkung auf die Anthocyan-synthese nachgewiesen werden konnte, scheint es, daß diese Reaktion in Keimlingen und Gewebekulturen nicht vom Phytochromsystem beeinflusst wird. Es ist möglich, daß die lange Induktionszeit an diesem negativen Ergebnis beteiligt ist. Durch die hohe Intensität, die zur Induktion der Anthocyanbildung notwendig war, wie durch die lange Bestrahlungsdauer, durch die es erst zur Pigmentsynthese im Gewebe kam, könnte das Phytochrom zerstört worden sein. Es ist ebenfalls möglich, daß durch diese Behandlung in den Zellen eine Veränderung hervor-

gerufen wurde, die eine Wirkung des Phytochromsystems verhinderte. Wesentlich ist, daß diese Indifferenz gegenüber einer Bestrahlung im Phytochrombereich gleichermaßen eine Eigenschaft der Gewebekulturen wie auch der Keimlinge zu sein scheint. Daher kann schließlich auch noch das Fehlen des Phytochromsystems bei *Haplopappus gracilis* eine Erklärung dafür sein, daß Reaktionen auf Hell- und Dunkelrotlicht geringer Intensität niemals festzustellen waren.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Biosynthese des Anthocyans in Gewebekulturen und intakten Keimlingen von *Haplopappus gracilis* erwies sich als eine lichtabhängige Reaktion, die nur durch Blaulicht induziert werden kann. Zur Induktion der Synthese war bei Gewebekulturen eine Intensität von $2550 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ und bei Keimlingen von $10\,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ erforderlich. In beiden Objekten trat das Anthocyan erst 24 Stunden nach Beginn der Bestrahlung auf.

Bei Gewebekulturen kann diese Verzögerung in eine Präinduktionsphase (9 Stunden) und eine Induktionsphase (16 bis 17 Stunden) unterteilt werden. Durch eine Bestrahlungsdauer über die Präinduktionsphase hinaus wird die Anthocyanbildung induziert und dann anschließend im Dunkeln (Dunkelphase) abgeschlossen werden.

An die Verzögerungsphase schloß sich ein linearer Anstieg der Pigmentsynthese an, der bei fort dauern-der Bestrahlung nach 5 Tagen zu einer Sättigung führte. Steigerung der Intensität und Erhöhung der Temperatur bewirkte eine Förderung der Anthocyanbildung. Bei Gewebekulturen konnte durch Herabsetzen der Temperatur in der Dunkelphase anschließend an die Bestrahlung eine weitere Synthesesteigerung erzielt werden.

Verschiedene Stämme von *Haplopappus* Gewebekulturen reagierten auf Licht gleicher Intensität und Dauer verschieden stark.

Die Anthocyansynthese der Gewebekulturen war von der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig. Durch Zugabe von geringen Mengen Gibberellinsäure (10^{-10} g/ml) konnte die Pigmentsynthese vollständig

gehemmt werden. Eine Erhöhung des Stickstoffangebotes durch Zusatz von Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Glutaminsäure zum White'schen Medium führte ebenfalls zur Hemmung der Synthese.

Zucker war als Bestandteil des Mediums eine notwendige Voraussetzung für die Pigmentbildung der Gewebekulturen. Glucose und Fruktose erwiesen sich als ebenso wirksam wie Saccharose. Keimlinge, die im Dunkeln auf einem Nährboden ohne Zucker gezogen worden waren, konnten bereits 10 Tage nach der Keimung bei Bestrahlung mit Blaulicht kein Anthocyan mehr bilden. Durch Fütterung von Zucker wurde dem Keimling die Synthesefähigkeit zeitlich nahezu unbegrenzt erhalten.

Anthocyan trat in allen Organen des Keimlings auf. Verletzung der Pflanze rief eine Synthesesteigerung in den Kotyledonen hervor. Die Isolierung der Organe voneinander beeinträchtigte die Anthocyanbildung in Hypokotyl und Wurzel nicht. In den Kotyledonen bewirkte sie eine Steigerung der Synthese.

Das Wirkungsspektrum der Anthocyanbildung der Gewebekulturen und intakten Keimlinge von *Haplopappus gracilis* ist zweigipflig und weist ein Maximum bei 372 nm und ein weiteres bei 438 nm. Die Grenze der Aktivität zum langwelligen hin lag zwischen 474 und 493 nm. Rotlicht war für die Induktion der Pigmentsynthese unwirksam. Als Photorezeptor für die Lichtreaktion wird ein Flavin angenommen.

Im Gegensatz zu den intakten Pflanzen bildeten isolierte Kotyledonen und verletzte Keimlinge nicht nur im Blaubereich, sondern auch bei Bestrahlung mit Rotlicht hoher Intensität Anthocyan. Das Wir-

kungsspektrum der Anthocyansynthese der isolierten Kotyledonen hat ein deutliches Maximum um 440 nm und ein weiteres bei 660 nm. Geringe Aktivität zeigte sich über das gesamte sichtbare Spektrum. Die durch Rotlicht induzierte Pigmentbildung ließ sich durch den Photosynthesehemmstoff DCMU vollständig unterbinden. Das deutet darauf hin, daß bei der durch Verletzung hervorgerufenen Rotlichtaktivität das Chlorophyll als Photorezeptor dient.

Die Anthocyansynthese in Gewebekulturen und Keimlingen konnte durch Hell- und Dunkelrotbestrahlungen geringer Energie nicht beeinflußt werden. Das galt auch nach vorhergehender Induktion durch Blaulicht hoher Intensität. Damit erscheint es als sicher, daß das Phytochromsystem an der Anthocyansynthese von *Haplopappus gracilis* nicht beteiligt ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- Arnold, A.: zitiert in Siegelman: Physiological Studies on Phenolic Biosynthesis. Biochem of Phen. Comp. Ed.: Harborne 437-456 (1964)
- Arthur, J.M.: Red Pigment Production in Apples by Means of Artificial Light Sources. Contrib. Boyce Thompson Inst. 4: 1-18 (1932)
- Blank, F.: Über den Einfluß von Zuckerlösungen auf die Anthocyanbildung in Rotkohlkeimlingen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 61: 49-51 (1951)
- : Anthocyanins, flavones, xanthenes Handbuch der Pflanzenphysiologie 10, 300-353 (1958)
- Downs, R.J. und H.W. Siegelman: Photocontrol of anthocyanin synthesis in milo seedlings. Plant Physiol. 38: 25-30 (1963)
- : Photocontrol of anthocyanin synthesis. J.Wash. sci. 54: 112-120 (1964)
- , H.W.Siegelman, W.L. Butler and S.B.Hendricks: Photoreceptive Pigments for the Anthocyanin Synthesis in Aple Skin. Nature, 205: 909-910
- Durst, F. und Mohr, H.: Phytochrom-mediated Induktion of Enzym Synthesis in Mustard Seedlings (Sinapis alba L.). Naturwissenschaften, 53, S.531 (1966)
- , -----: Half-Life of Phytochrom-Induced Phenylalanin Deaminase in Mustard Seedlings (Sinapis alba L.). Naturwissenschaften, 53, S.707 (1966)
- Eberhardt, F.: Über die Beziehungen zwischen Atmung und Anthocyan-synthese. Planta (Berl.) 43: 253-287 (1954)
- : Über die Beziehungen zwischen Anthocyan-bildung und Stickstoffumsatz. Planta, 53: 334-338 (1959)

- Eddy, B.P. and Mapson, L.W.: Some factors affecting anthocyanin synthesis in cress seedlings.
Biochem. Journ. 49: 694-699 (1951)
- Furuya, M. and K.Thimann: The Biosynthesis of Anthocyanins XI. Effects of Gibberellic Acid in Two Species of Spirodela.
Arch. of Biochem. and Biophys. 108: 109-116 (1964)
- Gellert, W., H.Küster, M.Hellwich und H.Kästner:
Kleine mathematische Enzyklopädie
(1965) S. 671
- Grill, R.: Photocontrol of anthocyanin formation in turnip seedlings. I. Demonstration of Phytochrome Action.
Planta (berl.), 66: 293-300 (1965)
- , and D.Vince: Anthocyanin formation in turnip seedlings. Evidence for two light steps in the biosynthesis pathway.
Planta (Berl.), 63: 1-12 (1965)
- Hartmann, K.M.: A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome.
Photochem. and Photobiol., 5, S.349-366 (1966)
- Havelstange, A. at R.Schumacker: Métabolisme des anthocyanes dans les plantules de Sinapis alba L. I. Le rôle de la lumière.
Soc. roy. Sci. Liège, 35: 125-141 (1966)
- Heath, O.V.S. and D.Vince: Some non-photosynthetic effects of light on higher plants with special reference to wavelength.
Symp.Soc.Expl.Biol., 16: 110-137 (1962)
- Hendricks, S.B. and H.A.Borthwick: Photocontrol of plant development by simultaneous excitation of two interconvertible pigments.
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 45: 344-349 (1959)

- Hendricks, S.B. and H.A.Borthwick: Photocontrol
of plant development by the simultaneous
excitation of two interconvertible pigments.
II. Theory and control of anthocyanin
synthesis.
Bot. Gaz., 120: 187-193 (1959 b)
- : Control of plant growth by phytochrome.
Comparative Effects of Radiation, pp.22-43,
1960 (New York: Wiley a. Sohn inc.)
- : The photoreactions controlling photoperio-
dism and related responses.
Comparative Biochemistry of Photoreactive
Systems 1960 b (New York: Acad. Press)
- Jeremias, K.: Über den Jahresgang einiger Zucker in
den Blättern von Hedera helix L.
Planta (Berl.), 52: 195-205 (1958)
- Kandeler, R.: Über die Lichtabhängigkeit der Antho-
cyanbildung.
Flora (Jena), 149: 487-519 (1960)
- Magness, J.R.: Observations on color development
in apples.
Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 25: 289-292 (1928)
- Malaviya, B. and M.M. Laloraya: I. Locus of Anthicyanin
Formation and Effect of Seedlings Age.
Arch. Biochem. and Biophys., 114: 56-60 (1966)
- Mohr, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf
das Längenwachstum des Hypokotyls und auf die
Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis
alba L.
Planta (Berl.), 49: 389-405 (1957)
- , Wirkungen kurzwelligen Lichtes.
Handbuch der Pflanzenphysiol., 16: 439-531
(1961)
- , und G.Schoser: Eine Interferenzfilter -
Monochromatoranlage für photobiologische
Zwecke.
Planta (Berl.), 53: 1-17 (1959)

- Mohr, H. und W. van Nes: Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Flavonoidsynthese und Morphogenese der Buchweizenkeimlinge (*Fagopyrum esculentum* Moench). I. Die Synthese von Anthocyan.
Z.Bot., 51: 1-16 (1963)
- Schoser, G.: Eine Anlage zur Erzeugung monochromatischer Strahlung für photobiologische Untersuchungen.
Ber. D. Bot. Ges., 79, S.271-278 (1966)
- Murashige und Skoog: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture.
Physiologia Plantarum, 15: 473-497 (1962)
- Nitsch, C. et J.P.Nitsch: Effet de la lumière sur l'induction de la phénylalanin - desaminase dans les tissus de tubercule d'*Helianthus tuberosus* L.
C.R. Acad. Sc. Paris, 10: 1102-1105 (1966)
- Paech, K. und F.Eberhardt: Untersuchungen zur Biosynthese der Anthocyane.
Zschr. Naturforsch., 7 b: 664-670 (1952)
- Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen (Eine neue t-Tafel)
Biol. Zbl., 63: 152-168 (1943)
- Raschke, K.: Eine Anlage zur monochromatischen Bestrahlung biologischer Objekte ausgerüstet mit Interferenzfiltern und einer elektronisch geregelten 2,5 kW-Xenonlampe.
Planta (Berl.), 75: 55-72 (1967)
- Reinert, J. und Torrey, A.: Über die Kultur von Geweben aus *Haplopappus gracilis*.
Naturwissenschaften, 48: 132-133 (1961)
- , H.Clauss und R. von Ardenne: Anthocyanbildung von *Haplopappus gracilis* in Licht verschiedener Qualität.
Naturwissenschaften, 51: 87 (1964)

- Reinert, J. und P.R. White: The cultivation of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*.
Physiol. Plant., 9: 177-189 (1956)
- Scherf, H. und M.H. Zenk: Induktion of anthocyanin and phenylalanine ammonia-lyase formation by a high energy light reaction and its control through the phytochrome system.
Ztschr. Pflanzenphysiol., 56: 203-206 (1967)
- Schoer, G.: Eine Anlage zur Erzeugung monochromatischer Strahlung für photobiologische Untersuchungen.
Ber. D. Bot. Ges., 79, S.271-278 (1966)
- Siegelman, H.W. and S.B.Hendricks: Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings.
Plant Physiol., 32: 393-398 (1957)
- , -----: Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin.
Plant Physiol., 33: 185-190 (1958)
- , -----: Photocontrol of alcohol aldehyde and anthocyanin production in apple skin.
Plant Physiol., 33: 409-413 (1958 b)
- , and W.L.Butler: Properties of phytochrome.
Ann. Rev. of Plant Physiol., 16: 383-392 (1965)
- Slabecka - Sweykowska: On the condition of anthocyanin formation in the *Vitis vinifera* tissue cultivated in vitro.
Acta. Soc. Botan. Pol., 21: 537-576 (1952)
- : On the influence of the wavelength of light on the biogenesis of anthocyanin pigment in the *Vitis vinifera* tissue in vitro.
Acta. Soc. Botan. Pol., 24: 3 (1955)

- Thimann, K.V. and M.Edmondson: The Biogenesis of Anthocyanins. I. General Nutritional Conditions Leading to Anthocyanin Formation. Arch. of Biochem., 22: 33-53 (1949)
- , and T.Radner: The Biogenesis of Anthocyanins III. The Role of Sugars in Anthocyanin Formation. Arch. Biochem. Biophys., 34: 306-323 (1951)
- , -----: The Biogenesis of Anthocyanins VII. The Requirement for Both: Purins and Pyrimidins. Arch. Biochem. Biophys., 96: 270-279 (1962)
- White, P.R.: The Cultivation of Animal and Plant Cells. New York, Ronald Press 1943
- Withrow, R.B. and A.P.Withrow: Generation, control and measurement of visible and near-visible radiant energy. Radiation Biology, 3: 125-258 (1956)
- , Klein, Price and Elstad: Influence of visible and near infrared radiant energy on organ development and pigment synthesis in bean and corn. Plant Physiol., 28: 1-15 (1953)
- Wolf, J.: Kohlenhydratstoffwechsel massiger Speicherorgane nach Abschluß der Speicherung, Lagerung, Kältekonservierung. Handbuch der Pflanzenphysiologie, 6: 881-908 (1958)
- YUK LIN NG, K.V.Thimann and S.A.Gordon: The Biogenesis of anthocyanin. X. The action spectrum for anthocyanin formation in Spirodela oligorhizza. Arch. Biochem. Biophys., 107: 550-558 (1964)
- Zucker, M.: Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potatoe Tuber Tissue. Plant Physiol., 40: 779-784 (1955)

Diese Arbeit wurde in den Jahren 1965 bis 1968 im Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung von Herrn Professor Dr. J.Reinert durchgeführt.

LEBENS LAUF

Am 11. Juni 1943 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Otto Lackmann und seiner Ehefrau Irene, geb. von Walther in Berlin geboren.

Von 1949 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Holzminden an der Weser, anschließend die Gärtnerschule (Grundschule) in Essen-Hbf. Seit Ostern 1953 ging ich zur Luisenschule (Mädchengymnasium), schließlich von 1955 bis 1962 zum Mädchendynnasium Essen-Bredeney. Hier bestand ich im Februar 1962 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1962 begann ich an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg mit dem Studium der Biologie. Zum Wintersemester 1963/64 schrieb ich mich an der Freien Universität ein. Hier legte ich im Oktober 1964 das Vordiplom- und im April 1966 das Diplomexamen in Biologie ab.

Seit dem Sommersemester 1966 bin ich wissenschaftliche Hilfsassistentin und Doktorandin im Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität.

Meine akademischen Lehrer waren vor allem die Herren Professor Dr. J.Reinert, Professor Dr. Th.Eckardt, Priv.-Doz. H.Clauss (Botanik); Professor Dr. W.Ulrich, Professor Dr. K.Ulrich, Professor Dr. Hassenstein (Zoologie), Professor Dr. H.Lüers (Allg. Biologie und Genetik), Professor Dr. Lüttringhaus (Chemie), Professor Dr. H.Lassen (Physik).

